

Einfluss des GpsB-Proteins auf die Zellwandsynthese, die Zellteilung und die Virulenz von *Listeria monocytogenes*

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften

der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Jeanine Rismondo

aus Magdeburg

1. Referentin:

Professorin Dr. Antje Flieger

2. Referentin:

Professorin Dr. Susanne Engelmann

3. Referent:

Professor Dr. Marc Bramkamp

eingereicht am:

24.02.2016

mündliche Prüfung (Disputation) am:

07.06.2016

Druckjahr 2016

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Rismondo J. Möller L, Aldridge C, Gray J, Vollmer W, Halbedel S. Discrete and overlapping functions of peptidoglycan synthases in growth, cell division and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol*, 95(2), 332-51, (2015).

Rismondo J. Cleverley RM, Lane HV, Großhennig S, Steglich A, Möller L, Mannala GK, Hain T, Lewis RJ, Halbedel S. Structure of the bacterial division determinant GpsB and its interaction with penicillin binding proteins. *Mol Microbiol*, 2015 Nov 17. doi: 10.1111/mmi.13279.

Tagungsbeiträge

Rismondo J. Großhennig S, Steglich A, Laue M, Halbedel S. GpsB impacts on division, growth and virulence of *Listeria monocytogenes* by controlling penicillin binding protein A1. (Talk). *BACELL* 2014. Bratislava, Slovakia (2014).

Rismondo J. Möller L, Aldridge C, Gray J, Vollmer W, Halbedel S., Discrete and overlapping roles of the five high molecular weight penicillin binding proteins in cell division, growth and virulence of *Listeria monocytogenes*. (Talk). *BACELL* 2015. Amsterdam, Niederlande (2015).

Posterbeiträge

Rismondo J. Großhennig S, Halbedel S. Functional characterization of the DivIVA-homologue GpsB in *Listeria monocytogenes*. (Poster) CBP008. Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM). Bremen (2013).

Rismondo J. Großhennig S, Halbedel S. Functional characterization of the DivIVA-homologue GpsB in *Listeria monocytogenes*. (Poster) P68. 7th International Conference on Gram-Positive Microorganisms. Montecatini Terme, Tuscany, Italy (2013).

Rismondo J, Möller L, Halbedel S. Penicillin binding protein functions essential for growth and cell division of *Listeria monocytogenes*. (Poster) CBP12. 4. Gemeinsamen Kongress der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) und der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM). Dresden (2014).

Rismondo J, Großhennig S, Steglich A, Möller L, Mannala GK, Hain T, Halbedel S. *Listeria monocytogenes* GpsB is a functional paralogue of the cell division protein DivIVA. (Poster) CCP05. Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM). Marburg (2015).

Rismondo J, Möller L, Aldridge C, Gray J, Vollmer W, Halbedel S. Discrete and overlapping roles of the five high molecular weight penicillin binding proteins in cell division, growth and virulence of *Listeria monocytogenes*. (Poster) P69. 8th International Conference on Gram-Positive Microorganisms. Montecatini Terme, Tuscany, Italy (2015).

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
Zusammenfassung	X
Summary	XI
1. Einleitung	1
1.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	1
1.2. Infektionszyklus	2
1.3. Behandlung der Listeriose	4
1.4. Antibiotika	5
1.5. Peptidoglykansynthese	6
1.6. Penicillin-bindende Proteine (PBPs)	9
1.7. Zellteilung und laterales Zellwachstum	11
1.8. DivIVA-Proteinfamilie	15
1.8.1. DivIVA	15
1.8.2. GpsB	19
1.9. Ziele der Arbeit	25
2. Material und Methoden	26
2.1. Bakterienstämme und Plasmide	26
2.2. Kultivierungsbedingungen	30
2.2.1. Nährmedien und Zusätze für Bakterien	30
2.2.2. Kultivierungsbedingungen und Stammhaltung	30
2.3. Molekulargenetische Arbeiten mit DNA	31
2.3.1. Isolierung von DNA	31
2.3.2. DNA-Techniken	32
2.3.3. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	34
2.3.4. Genomsequenzierung	39
2.3.5. DNA-Transfer und Selektion rekombinanter Klone	42
2.4. Molekulargenetische Arbeiten mit RNA (Northern-Blot)	44
2.4.1. Isolation von RNA aus <i>L. monocytogenes</i>	44
2.4.2. Denaturierendes RNA-Gel	45
2.4.3. Vakuumblotting der RNA	45
2.4.4. Herstellung von RNA-Sonden	46
2.4.5. Überprüfung der RNA-Sonde und Detektion des Northern Blots	47

2.5. Proteinbiochemische Methoden	47
2.5.1. Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	47
2.5.2. Isolation zellulärer Proteine von <i>L. monocytogenes</i>	48
2.5.3. Fraktionierung von Proteinproben	48
2.5.4. Proteinbestimmung nach Bradford	49
2.5.5. Lineare SDS-PAGE (Laemmli, 1970)	49
2.5.6. Blue Native PAGE	50
2.5.7. Gelfärbung mit Coomassie	50
2.5.8. Westernblot	51
2.5.9. Proteinnachweis durch Immunodetektion	51
2.5.10. PBP-Fluoreszenzgel	52
2.6. Das Bacterial Two-Hybrid-System (B2H-System)	53
2.7. Methoden zur phänotypischen Charakterisierung	54
2.7.1. Wachstumskurven	54
2.7.2. Autolyse-Assay	54
2.7.3. Antibiotika-Suszeptibilitäts-Test	54
2.7.4. Licht- und Fluoreszenzmikroskopie	55
2.7.5. Probenvorbereitung für Transmissions- und Rasterelektronenmikroskopie	55
2.8. Infektionsexperimente	56
2.8.1. Bestimmung der Invasionsrate und der intrazellulären Replikation in HeLa-Zellen	56
2.8.2. Bestimmung der intrazellulären Replikation in J774.A1-Mausmakrophagen	57
2.8.2. Plaque-Formation-Assay zur Bestimmung der Ausbreitung von Zelle zu Zelle ...	57
3. Ergebnisse	59
3.1. Biochemische Charakterisierung von GpsB	59
3.1.1. Aufreinigung von GpsB	59
3.1.2. Oligomerisierung von GpsB	59
3.1.3. Lokalisierung von GpsB	61
3.2. Generierung und Charakterisierung einer Δ gpsB-Deletionsmutante	62
3.2.1. Wachstumsdefekt einer <i>L. monocytogenes</i> Δ gpsB-Mutante	62
3.2.2. Die Deletion von <i>gpsB</i> beeinflusst die Autolyse und die Penicillinresistenz	63
3.3. High-molecular-weight Penicillin-bindende Proteine (HMW PBPs) von <i>L. monocytogenes</i>	66
3.3.1. Subzelluläre Lokalisierung der HMW PBPs	66
3.3.2. Deletion der <i>L. monocytogenes</i> <i>pbp</i> -Gene	69

3.3.3. Überprüfung der <i>L. monocytogenes pbp</i> -Mutanten.....	69
3.3.4. Wachstum der <i>pbp</i> -Mutanten	70
3.3.5. Die Abwesenheit der beiden bi-funktionalen PBPs ist letal	72
3.3.6. Zellmorphologie der <i>pbp</i> -Mutanten	73
3.3.7. Die Zellwand der <i>pbp</i> -Mutanten ist geschwächt.....	76
3.3.8. Gesteigerte Lysozymresistenz durch die Deletion von <i>gpsB</i> und <i>pbpB1</i>	80
3.3.9. Virulenz der <i>pbp</i> -Mutanten	83
3.4. Die Deletion von <i>gpsB</i> führt zur verringerten Virulenz	86
3.5. Eine Δ <i>gpsB</i> Δ <i>divIVA</i> -Doppelmutante hat einen starken Zellteilungsdefekt	87
3.6. GpsB reguliert die Aktivität von PBP A1	88
3.6.1. Die Deletion von <i>pbpA1</i> supprimiert den Δ <i>gpsB</i> -Phänotyp.....	88
3.6.2. GpsB reguliert die Aktivität von PBP A1	90
3.6.3. Ein Ungleichgewicht zwischen Transpeptidierung und Transglykosylierung in der Δ <i>gpsB</i> -Mutante.....	92
3.7. Komplementationsstudien zur Identifizierung funktioneller Aminosäuren in GpsB....	93
3.8. Analyse von Δ <i>gpsB</i> -Suppressoren	96
3.8.1. Identifikation von Δ <i>gpsB</i> -Suppressormutationen.....	96
3.8.2. Suppression des Δ <i>gpsB</i> -Phänotyps durch Deletion von <i>murZ</i>	100
3.8.3. Die MurA-Mengen beeinflussen den Δ <i>gpsB</i> -Phänotyp	101
3.8.4. Suppression des Δ <i>gpsB</i> -Phänotyps durch Deletion von <i>clpC</i>	103
3.8.5. Erhöhte MurA-Mengen in den <i>shg</i> -Suppressoren.....	103
3.8.6. Die <i>murA</i> -Transkriptmengen sind unverändert.....	104
3.8.7. Suppression des Δ <i>gpsB</i> -Phänotyps durch Deletion von <i>lmo1503</i> , <i>lmo1549</i> , <i>lmo1921</i> und <i>lmo2550</i>	105
3.8.8. Zwei Arten der Suppression des Δ <i>gpsB</i> -Phänotyps	108
3.8.9. Suppression des Δ <i>gpsB</i> -Phänotyps durch Mutationen in UDP-GlcNAc- konsumierenden Stoffwechselwegen	109
3.8.10. GpsB interagiert mit Lmo1503, Lmo1921, PBP A1 und DivIVA.....	111
4. Diskussion	113
4.1. GpsB reguliert die Aktivität von PBP A1 in <i>L. monocytogenes</i>	113
4.2. Kristallstruktur von GpsB	114
4.3. Letalität der Δ <i>pbpA1</i> Δ <i>pbpA2</i> -Doppelmutante	116
4.4. Attenuation der <i>pbp</i> -Mutanten	117
4.4.1. Invasionsdefekt der Δ <i>pbpA1</i> - und Δ <i>pbpA2</i> -Mutanten	117
4.4.2. Attenuation der PBP B1- und PBP B2-Depletionsstämme.....	120

4.5. Attenuation der $\Delta gpsB$ -Mutante.....	122
4.6. Suppression des $\Delta gpsB$ -Phänotyps	123
4.6.1. Suppression des $\Delta gpsB$ -Phänotyps durch Mutationen in <i>murZ</i>	123
4.6.2. Suppression des $\Delta gpsB$ -Phänotyps durch Mutationen in <i>clpC</i>	126
4.6.3. Suppression des $\Delta gpsB$ -Phänotyps durch gesteigerte MurA-Proteinmengen.....	127
4.6.4. Suppression des $\Delta gpsB$ -Phänotyps durch Mutationen in UDP-GlcNAc- konsumierenden Stoffwechselwegen	131
4.6.5. MurA-unabhängige Suppression des $\Delta gpsB$ -Phänotyps	131
5. Referenzen.....	134
6. Anhang	153
Danksagung	158

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Massenprozent
A	Adenin
A ₅₉₅	Absorption bei 595 nm
Abb.	Abbildung
Abb. A	Abbildung Anhang
ad.	auffüllen auf
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATPase	Adenosintriphosphatase
B2H	Bacterial Two-Hybrid
BHI	Brain Heart Infusion
bidest	doppelt destilliert
bla	β-Laktamase
BN	Blue Native
Bocillin-FL	Bocillin™ FL Penicillin (Fluorescein-markiertes Penicillin)
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
c-di-AMP	zyklisches di-Adenosinmonophosphat
C-Terminus	Carboxyterminus
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cm	Zentimeter
CTD	zytoplasmatische Domäne
DD-CPase	DD-Carboxypeptidase
DEPC	Diethyldicarbonat
DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat

DUF	domain of unknown function
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
erm	Erythromycin
FCS	fetal calf serum (fetales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fw	forward
G	Guanosin
g	Gramm
GFP	grün fluoreszierende Protein
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GTPase	Guanosintriphosphatase
GW	Glycin-Tryptophan-Motiv
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMW	High-molecular-weight
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HSPG	Heparansulfatproteoglykan
I	IPTG-induzierbar
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid
JAMM	Jab1/MPN/Mov34 Metalloenzym
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
LB	Luria Bertani
LBD	Lipidbindedomäne
LLO	Listeriolysin
LMW	Low-molecular-weight
LPXTG	Leu-Pro-any-Thr-Gly-Motiv
LTA	Lipoteichonsäuren
kan	Kanamycin
kDa	Kilodalton
M	Molar
MALLS	multi-angle laser light scattering

<i>meso</i> -Dap	<i>meso</i> -Diaminopimelinsäure
mg	Milligramm
MHK	minimale Hemmkonzentration
MGT	mono-funktionale Transglykosylase
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mM	Millimolar
min	Minute
MSCRAMM	microbial surface components recognising adhesive matrix molecules
MurNAc	N-Acetylmuraminsäure
MW	Molekulargewicht
N-Terminus	Aminotерminus
neo	Neomycin
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	pathogen-associated molecular patterns
PBP	Penicillin-bindende Proteine
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDB	Proteindatenbank
P _{help}	IPTG-induzierbarer Promotor
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRR	Prolin-reiche Region
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RBS	Ribosomenbindestelle
REM	Rasterelektronenmikroskopie
rev	reverse
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAMP	small archaeal modifier proteins
SDS	Natriumdodecylsulfat

SEC	Größenausschluss-Chromatographie
SGWB	Sucrose-Glycerol-Waschpuffer
<i>shg</i>	suppression of heat sensitivity of $\Delta gpsB$
T	Thymin
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TES	Tris-EDTA-SDS
TG	Transglykosylase
TP	Transpeptidase
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
UDP	Uridindiphosphat
UV	ultraviolett
V	Volt
Van-FL	Vancomycin-FL (Fluorescein-markierten Vancomycin)
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-Galactopyranosid
x g	relative Zentrifugalkraft
μ F	Mikrofarad
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar
μ m	Mikrometer
λ	Wellenlänge
Ω	Ohm

Ein- und Drei-Buchstaben-Code der Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

Zusammenfassung

DivIVA-Proteine sind hochkonservierte Zellteilungsproteine in Firmicutes und Aktinobakterien und akkumulieren an negativ gekrümmten Membranen, die an den Zellpolen und den Septen vorkommen. In den Aktinobakterien und einigen Firmicutes ist *divIVA* essenziell. Durch die Interaktion mit verschiedenen Proteinen spielen DivIVA-Proteine eine wichtige Funktion in vielen zellulären Prozessen, wie z.B. der Sporulation und Chromosomensegregation in *Bacillus subtilis*. Im humanpathogenen Bakterium *Listeria monocytogenes* rekrutiert DivIVA Komponenten des Min-Systems, die an der Zellteilung beteiligt sind, an das Septum, wodurch sich die Deletion von *divIVA* in einem Zellteilungsdefekt äußert. Zudem ist DivIVA in *L. monocytogenes* essenziell für die Virulenz. In Firmicutes ist ein DivIVA-Paralog namens GpsB codiert, das in *B. subtilis* zu den späten Zellteilungsproteinen zählt. In diesem Organismus sind GpsB und EzrA für die subzelluläre Lokalisation des Penicillin-bindenden Proteins PBP1 verantwortlich. In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion des GpsB-Proteins von *L. monocytogenes* untersucht.

In *L. monocytogenes* ist GpsB hauptsächlich an den Septen und der lateralen Zellwand lokalisiert und interagiert ebenfalls mit dem bi-funktionalen PBP PBP A1, dem *B. subtilis* PBP1-Homolog. Die Deletion von *gpsB* in *L. monocytogenes* führte zu einem Zellteilungsdefekt, einem drastischen Wachstumsdefekt und war bei 42°C sogar letal. Eine erhöhte Penicillinsensitivität und eine Erhöhung der spontanen Autolyse der Δ *gpsB*-Mutante wiesen auf eine gestörte Peptidoglykanbiosynthese hin. GpsB hatte keinen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von PBP A1, scheint jedoch an der Regulation der PBP A1-Aktivität beteiligt zu sein, da die Δ *gpsB*-Mutante sensitiv gegenüber einer von der Transpeptidase-Aktivität entkoppelten Transglykosylase-Aktivität in PBP A1 war.

Die Δ *gpsB*-Mutante bildete bei 42°C spontane Suppressoren auf BHI-Agarplatten, mit deren Hilfe weitere Interaktionspartner von GpsB identifiziert werden konnten. Die Akkumulation von MurA, einer UDP-N-Acetylglucosamin 1-Carboxyvinyltransferase, die den ersten Schritt der Peptidoglykanbiosynthese katalysiert, hatte einen supprimierenden Effekt auf das Wachstum der Δ *gpsB*-Mutante. Erhöhte MurA-Mengen können vermutlich die beeinträchtigte Aktivität von PBP A1 in der Δ *gpsB*-Mutante kompensieren.

In Infektionsexperimenten mit Wachsmottenlarven zeigte sich zudem eine starke Attenuation der Δ *gpsB*-Mutante, die vergleichbar mit Mutanten war, in denen wichtige Virulenzfaktoren deletiert wurden. GpsB ist somit essenziell für die Virulenz von *L. monocytogenes* und könnte möglicherweise als Angriffspunkt für neue Antibiotika dienen.

Summary

DivIVA proteins are highly conserved cell division proteins in firmicutes and actinobacteria and accumulate at membranes with negative curvature, which are found at the cell poles and the division septa. The *divIVA* gene is essential in actinobacteria and some firmicutes. Due to its interaction with different proteins, DivIVA is important for many cellular processes, like sporulation and chromosome segregation in *Bacillus subtilis*. In the human pathogen *Listeria monocytogenes*, DivIVA is responsible for the recruitment of components of the Min-system to the division site. Because of this, deletion of *divIVA* results in a cell division defect in *L. monocytogenes*. More importantly, DivIVA is also essential for the virulence of *L. monocytogenes*.

Firmicutes possess a DivIVA-paralog called GpsB, which is a late cell division protein in *B. subtilis*. In this organism, GpsB and EzrA are responsible for the subcellular localization of the penicillin binding protein PBP1. In this thesis, the function of GpsB in *L. monocytogenes* was studied.

In *L. monocytogenes*, GpsB is mainly found at the division sites and the lateral wall. It also interacts with the bi-functional penicillin binding protein PBP A1, which is the homolog of *B. subtilis* PBP1. Deletion of *gpsB* in *L. monocytogenes* resulted in impaired cell division, in a severe growth defect and is even lethal at 42°C. Increased penicillin sensitivity and a high degree of spontaneous autolysis suggested that peptidoglycan biosynthesis is disturbed in the Δ *gpsB* mutant. GpsB had no impact on the localization of PBP A1, but it seems to be responsible for the regulation of PBP A1 activity, since the Δ *gpsB* mutant was sensitive against mutations that uncouple the transglycosylase from the transpeptidase activity of PBP A1.

The Δ *gpsB* mutant formed spontaneous suppressors on BHI agar plates when grown at 42°C, which allowed identification of further GpsB interaction partners. Furthermore, accumulation of MurA, an UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase, which is responsible for the first step of the peptidoglycan biosynthesis, leads to a suppression of the growth defect of the Δ *gpsB* mutant. Increased MurA protein level could therefore compensate for an impaired activity of PBP A1 in the Δ *gpsB* mutant.

Infection experiments with *Galleria mellonella* revealed a strong attenuation of the Δ *gpsB* mutant, which is comparable to mutants, where important virulence factors are absent. Hence, GpsB is essential for virulence of *L. monocytogenes* and could maybe serve as a target for new antibiotics.

1. Einleitung

1.1. *Listeria monocytogenes*

E.G.D. Murray und Kollegen beschrieben im Jahr 1926 ein neues Bakterium, das während einer Tierseuche aus Kaninchen und Meerschweinchen isoliert wurde. Aufgrund der hohen Anzahl an Monozyten im Blut der infizierten Tiere wurde es als *Bacterium monocytogenes* bezeichnet (Murray *et al.*, 1926). 1927 isolierte Pirie das gleiche Bakterium aus Rennmäusen und benannte es *Listerella hepatolytica* (Pirie, 1927). Um die Nomenklatur anzugleichen, wurde 1940 für dieses Bakterium die Bezeichnung *Listeria monocytogenes* festgelegt. Die Gattung *Listeria* gehört zum Phylum der Firmicutes, die sich durch einen niedrigen G+C-Gehalt (38%) auszeichnen und umfasst 17 verschiedene Arten: *L. aquatica*, *L. booriae*, *L. cornellensis*, *L. fleischmannii*, *L. floridensis*, *L. grandensis*, *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. marthii*, *L. monocytogenes*, *L. newyorkensis*, *L. riparia*, *L. rocourtiae*, *L. seeligeri*, *L. weihenstephanensis* und *L. welshimeri* (Wilkinson und Jones, 1977, Seeliger, 1981, Rocourt und Grimont, 1983, Seeliger *et al.*, 1984, Rocourt *et al.*, 1992, Vazquez-Boland *et al.*, 2001, Graves *et al.*, 2010, Leclercq *et al.*, 2010, Bertsch *et al.*, 2013, Lang Halter *et al.*, 2013, den Bakker *et al.*, 2014, Weller *et al.*, 2015). *L. monocytogenes* kann Erkrankungen im Menschen und in Tieren verursachen, *L. ivanovii* dagegen hauptsächlich in Tieren. *L. ivanovii* und *L. seeligeri* wurden in wenigen Fällen bei humanen Infektionen nachgewiesen (Robert-Koch-Institut, 2015). Die anderen *Listeria*-Arten sind, soweit bekannt, nicht pathogen (Cossart, 2007, Chiara *et al.*, 2015).

Listeria spp., z.B. *L. monocytogenes*, sind fakultativ anaerobe, nicht-sporenbildende Gram-positive Stäbchen (Bigland, 1950, Collins *et al.*, 1991). In extrazellulären Umgebungen können sie sich mit Hilfe von Flagellen bei Temperaturen von bis zu 30°C fortbewegen, bei höheren Temperaturen sind sie nicht motil (Seeliger, 1958, Peel *et al.*, 1988, Way *et al.*, 2004). *L. monocytogenes* kommt überall in der Natur vor, z.B. in der Erde, im Wasser und kann auf Pflanzenmaterialien als Saprophyt leben (Welshimer und Donker-Voet, 1971, Hamon *et al.*, 2006, Ramaswamy *et al.*, 2007, Freitag *et al.*, 2009).

Die Übertragung von *L. monocytogenes* erfolgt meist durch orale Aufnahme kontaminierter Lebensmittel durch den Menschen oder durch kontaminiertes Tierfutter (Schlech *et al.*, 1983, Low und Donachie, 1997, Driehuis und Oude Elferink, 2000, Gandhi und Chikindas, 2007). Aufgrund der Resistenz gegenüber Säuren und hohen Salzkonzentrationen sowie der Fähigkeit, sich bei niedrigen Temperaturen (3 bis 10°C) vermehren zu können (Welshimer, 1960, Nkuo und Ekwu, 1980, Swaminathan und Gerner-Smidt, 2007), kann eine Verbreitung von *L. monocytogenes* durch kontaminierte Lebensmittel erfolgen. Dabei wurde *L.*

monocytogenes häufig aus Fleisch- und Fischprodukten, Meeresfrüchten, Salat und Gemüse sowie aus Milchprodukten, wie z.B. Eiscreme, Rohmilch und gereiftem Weichkäse, isoliert (Aureli *et al.*, 2000, Ramaswamy *et al.*, 2007).

Die Infektion mit *L. monocytogenes* äußert sich in gesunden Menschen meist durch eine selbst-limitierende fiebrige Gastroenteritis, kann aber bei älteren Menschen, schwangeren Frauen und immunsupprimierten Menschen zu ernsthaften systemischen Verläufen, der sogenannten invasiven Listeriose führen. Bei Patienten, die ein geschwächtes Immunsystem aufweisen, kann die Infektion mit *L. monocytogenes* eine Septikämie, Meningitis oder Encephalitis verursachen, bei Schwangeren kann es zu Früh- oder Fehlgeburten kommen (Gray *et al.*, 1955, Low und Donachie, 1997, Hamon *et al.*, 2006, Ramaswamy *et al.*, 2007, Drevets und Bronze, 2008). Die Inkubationszeit beträgt 5-70 Tage, wodurch die Zuordnung der Infektionsursache zu einem kontaminierten Lebensmittel schwierig ist (Swaminathan und Gerner-Smidt, 2007). Die Inzidenz der Listeriose liegt im Vergleich zu gastrointestinalen Erkrankungen mit anderen Erregern, wie *Salmonella* und *Campylobacter*, mit 308-608 Fällen in Deutschland pro Jahr (2005-2014) etwa 100-fach niedriger (Werber *et al.*, 2013, Robert-Koch-Institut, 2015). Dennoch zählt die Listeriose in Europa zu den Infektionen mit den höchsten lebensmittelassoziierten Todesfällen (Allerberger und Wagner, 2010), da sie eine Mortalitätsrate von 10-30% aufweist (Lorber, 1997, Hamon *et al.*, 2006, Koch und Stark, 2006, Ramaswamy *et al.*, 2007, Mook *et al.*, 2012).

1.2. Infektionszyklus

L. monocytogenes ist ein fakultatives intrazelluläres Bakterium, dass die eigene Aufnahme in nicht-phagozytotische Zellen induziert (Ramaswamy *et al.*, 2007). Bei der Listeriose wird zwischen der nicht-invasiven gastrointestinalen Listeriose, die vorrangig bei gesunden Menschen vorkommt, und der invasiven Listeriose unterschieden (Allerberger und Wagner, 2010, Camejo *et al.*, 2011). *L. monocytogenes* kann in verschiedene Zelltypen wie z.B. Epithelzellen, dendritische Zellen, Endothelzellen und Makrophagen eindringen, überleben und sich vermehren (Mackaness, 1962, Tilney und Portnoy, 1989, Kolb-Maurer *et al.*, 2000, Lecuit, 2007). Die Aufnahme von *L. monocytogenes* durch Makrophagen verläuft über Phagozytose, wohingegen die Invasion in Epithelzellen, Endothelzellen, Enterozyten, Hepatozyten und Fibroblasten über die Bindung der Internaline InlA und InlB an die Rezeptoren E-cadherin bzw. Met der Wirtszellen erfolgt (Gaillard *et al.*, 1991, Cossart und Lecuit, 1998, Parida *et al.*, 1998, Hamon *et al.*, 2006). Nach der Aufnahme von *L. monocytogenes* durch kontaminierte Lebensmittel gelangt das Bakterium in den Darm und

dringt über die Spitze des Bürstensaums (Mikrovilli) in die Darmepithelzellen ein (Pentecost *et al.*, 2006). Der Übertritt der Darmbarriere wird durch InlA vermittelt (Lecuit *et al.*, 2001). Bei gesunden Menschen kann die Infektion durch die zelluläre Immunantwort kontrolliert werden und breitet sich nicht weiter aus (Werbrouck *et al.*, 2006). Bei immunsupprimierten Patienten kann *L. monocytogenes* aufgrund der geschwächten zellulären Immunantwort in die Blutbahn und die mesenterialen Lymphknoten gelangen. Von da aus erreichen die Bakterien die Leber und die Milz und vermehren sich dort hauptsächlich in Leber- und Milzmakrophagen oder in Epithelzellen (Lecuit, 2007).

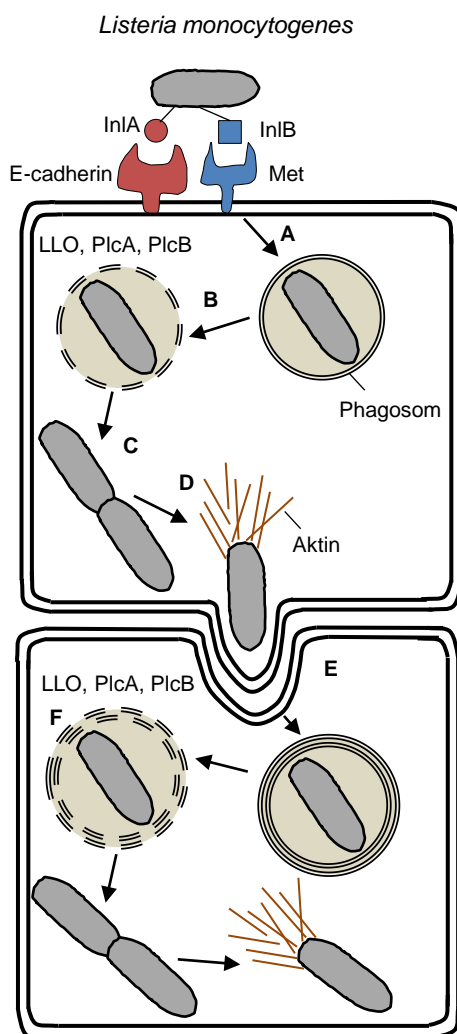


Abb. 1: Schematische Darstellung des Infektionszyklus von *L. monocytogenes*

(A) *L. monocytogenes* dringt in die Wirtszelle nach Bindung des Internalins InlA an den Rezeptor E-cadherin bzw. von InlB an den Rezeptor Met ein. (B) *L. monocytogenes* befindet sich im Phagosom, das durch die Sekretion und Aktivität der Phospholipasen PlcA und PlcB sowie des Toxins Listeriolysin O (LLO) lysiert wird. (C) Vermehrung von *L. monocytogenes* im Zytoplasma der Wirtszelle. (D) Umlagerung der Bakterienzelle mit Aktinfilamenten des Wirtes, die die Bewegung der Listerien-Zelle im Zytoplasma des Wirtes ermöglicht. (E) Ausbreitung von Zelle zu Zelle durch Ausstülpung der Wirtszelloberfläche. (F) Durch die Ausbreitung in die Nachbarzelle befindet sich die *Listeria*-Zelle in einer Vakuole mit einer doppelten Membran. Die Lyse der primären und sekundären Vakuole erfolgt durch PlcA, PlcB und LLO. Der Infektionszyklus kann wieder von vorn beginnen. Verändert nach (Hamon *et al.*, 2006, Travier und Lecuit, 2014).

Die initiale Internalisierung von *L. monocytogenes* in die Wirtszelle erfolgt durch induzierte Phagozytose, infolge dessen sind die Bakterien von einer Vakuole umgeben (Abb. 1). Der Austritt aus der phagozytischen Vakuole erfolgt durch die Sekretion der Phospholipasen PlcA und PlcB und des porenbildenden Toxins Listeriolysin O (LLO) (Cossart *et al.*, 1989, Hamon *et al.*, 2006). *L. monocytogenes* vermehrt sich anschließend im Zytoplasma der Wirtszelle und

bewirkt durch das oberflächenassoziierte Protein ActA die Polymerisierung des Aktins der Wirtszelle um die Bakterienzelle herum (Domann *et al.*, 1992, Kocks *et al.*, 1992, Kocks *et al.*, 1993). Durch Umlagerung der Aktinmoleküle wird ein Aktinschwanz gebildet, der die Motilität von *L. monocytogenes* im Zytosol ermöglicht. Die direkte Ausbreitung von *L. monocytogenes* erfolgt durch die Bildung einer Ausstülpung der Wirtszelloberfläche und den Durchtritt in die Nachbarzelle. Dabei wird eine sekundäre Vakuole um die *Listeria*-Zelle gebildet, die ebenfalls lysiert werden kann (Abb. 1). Danach kann ein neuer Infektionszyklus beginnen (Tilney und Portnoy, 1989, Kocks *et al.*, 1992, Ramaswamy *et al.*, 2007, Camejo *et al.*, 2011). Auf diese Weise kann *L. monocytogenes* alle Barrieren des menschlichen Körpers überqueren: die Darmbarriere, die Blut-Hirnschranke und die Plazentaschranke (Gray und Killinger, 1966, Berche, 1995, Cossart und Lecuit, 1998, Lecuit, 2005). Dabei führt der Übertritt der Blut-Hirnschranke zu Infektionen der Hirnhäute und des Gehirns und der Übertritt der Plazentaschranke kann zu Infektionen des Fetus führen (Gray *et al.*, 1955, Berche, 1995, Cossart und Toledo-Arana, 2008). Weiterhin bewirkt die Ausbreitung von Zelle zu Zelle, dass der Kontakt mit dem extrazellulären Kompartiment des Wirtes und damit der Immunabwehr auf niedrigem Level gehalten wird (Cossart und Lecuit, 1998, Hamon *et al.*, 2006).

1.3. Behandlung der Listeriose

Isolate von *L. monocytogenes* sind sensitiv gegenüber Penicillinen, Aminoglykosiden, Tetrazyklinen und Vancomycin. Die Resistenz gegenüber Cephalosporinen, Sulfomethoxazol und einigen Fluorochinolonen, z.B. Ciprofloxacin, ist hingegen erhöht (Jones und MacGowan, 1995, Troxler *et al.*, 2000, Lampidis *et al.*, 2002). Die *in vitro* ermittelten Antibiotika-Suszeptibilitäten von *Listeria* haben sich in den letzten 35 Jahren kaum verändert (Heger *et al.*, 1997, Conter *et al.*, 2009). In klinischen Isolaten haben sich selten Resistenzen entwickelt, in tierischen Isolaten konnten hingegen Resistenzveränderungen festgestellt werden (Hansen *et al.*, 2005, Srinivasan *et al.*, 2005). Das intrazelluläre Wachstum von *Listeria* erschwert die Wirkung einiger Antibiotika (Marget und Seeliger, 1988). Zur Behandlung invasiver Listerien werden hohe Dosen an Penicillin oder Ampicillin, oft in Kombination mit Aminoglykosiden wie Gentamycin, verabreicht (Gordon *et al.*, 1972, Swaminathan und Gerner-Smidt, 2007). Ein Problem in der Behandlung der Listeriose ist die bakteriostatische Wirkung von Penicillin und Ampicillin gegen *L. monocytogenes*, daher ist die körpereigene Immunabwehr von großer Bedeutung (Hof, 2003, Hof, 2004). Die Kombination von Penicillin und Gentamycin führte *in vitro* zu bakteriziden Effekten, kann

jedoch nicht bei schwangeren Personen angewendet werden (Hof, 2003, Hof, 2004, Allerberger und Wagner, 2010). Bislang konnte der Vorteil, den die Kombination der beiden Antibiotika *in vitro* zeigt, *in vivo* noch nicht bestätigt werden (Mitja *et al.*, 2009). In Tiermodellen konnte kein synergistischer Effekt von Penicillin und Gentamycin nachgewiesen werden (Blanot *et al.*, 1999). Bei Patienten mit einer Penicillin-Allergie werden Vancomycin/Teicoplanin, Trimethoprim/Sulfomethoxazol oder Erythromycin eingesetzt (Swaminathan und Gerner-Smidt, 2007, Allerberger und Wagner, 2010). Weiterhin wurden die Antibiotika Linezolid, Meropenem und Rifampicin erfolgreich für die Behandlung von *Listeria*-Infektionen eingesetzt (Mylonakis *et al.*, 2002, Morosi *et al.*, 2006). Um einen Rückfall der Erkrankung zu vermeiden, sollte die Antibiotika-Behandlung mindestens 14 Tage erfolgen (Disson *et al.*, 2008).

1.4. Antibiotika

Antibiotika werden zur Behandlung diverser bakterieller Infektionskrankheiten eingesetzt. Hierbei können sie entweder das Wachstum der Bakterien hemmen oder die Bakterien töten. Die Antibiotika wirken somit bakteriostatisch oder bakteriozid (Finberg *et al.*, 2004). Eine weitere Unterscheidungsmöglichkeit der Antibiotika sind die jeweiligen Angriffspunkte. Antibiotika, die eine klinische Anwendung finden, inhibieren meist Proteine der Zellwandbiosynthese (β -Laktame wie Penicillin, Ampicillin, Amoxcillin; Carbapeneme wie Meropenem oder Glykopeptide wie Vancomycin, Teicoplanin), der Proteinbiosynthese (Tetrazykline; Makrolid-Antibiotika wie Erythromycin oder Aminoglykoside wie Gentamycin) oder der Nukleinsäuresynthese (Fluorochinolone wie Ciprofloxacin oder Sulfonamide) (Bugg, 1999, Finberg *et al.*, 2004, Mitscher, 2005). Eine häufige und intensive Verwendung von Antibiotika für die Behandlung von Infektionen in Mensch und Tier und in der Landwirtschaft resultieren in einer weltweiten Verbreitung multiresistenter pathogener Bakterien (Witte, 1998, McManus *et al.*, 2002, Aarestrup, 2005, Cabello, 2006). Dabei werden in den Bakterien unterschiedliche Mechanismen zur Resistenzentwicklung angewandt: Veränderung des Angriffspunktes z.B. durch Mutationen, Veränderung der Zellpermeabilität, Einsatz von Effluxmechanismen oder der Abbau der Antibiotika. Zudem können Resistenzgene über horizontalen Gentransfer zwischen verschiedenen Organismen erworben werden (Moyed, 1964, Davies, 1994, Andersson, 2003, Livermore, 2003). Momentan sind bei ca. 70% der pathogenen Bakterien Resistenzen gegenüber den verwendeten Antibiotika nachgewiesen worden, was zu einer Mortalitätsrate der bakteriellen Infektionen von weltweit über 2 Mio. Menschen pro Jahr führt (Berdy, 2012). Daher gewinnt

die Herstellung neuer Antibiotika, die andere Angriffspunkte in den Bakterien haben, an zunehmender Bedeutung. Bakterielle Zellteilungsproteine und Proteine, die an der Zellwandbiosynthese beteiligt sind, erfüllen die Anforderungen an Angriffspunkte für Antibiotika. Angriffspunkte für Antibiotika sollten essenziell, konserviert und universell in Bakterien sein. Im Gegensatz dazu sollten diese Gene im Menschen nicht vorhanden sein oder keine essenzielle Funktion ausüben. Angriffspunkte, deren Funktion und Struktur bekannt sind, sind dabei von Vorteil. Darüber hinaus ist die Erreichbarkeit der Proteine für die Wirkung der Antibiotika entscheidend (Rao *et al.*, 2014). Viele Zellteilungsproteine und Proteine, die für die Zellwandbiosynthese benötigt werden, beispielsweise das Tubulin-Homolog FtsZ oder die UDP-N-Acetylglucosamin 1-Carboxyvinyltransferase MurA aus der Peptidoglykanbiosynthese, sind essenziell und sind in den meisten untersuchten Bakterien konserviert (Brown *et al.*, 1995, Du *et al.*, 2000, den Blaauwen, 2013, den Blaauwen *et al.*, 2014). Gegen diese beiden Proteine sind bereits Inhibitoren entwickelt worden, die in Tierversuchen heilende Wirkung entfalteten (Kahan *et al.*, 1974, Marquardt *et al.*, 1994, Haydon *et al.*, 2008).

1.5. Peptidoglykansynthese

Ein wichtiger Bestandteil der bakteriellen Zellwand ist das Peptidoglykan, da es den Bakterien ermöglicht, dem Turgor, der zwischen dem Zytoplasma und der extrazellulären Umgebung entsteht, stand zu halten (Weidel und Pelzer, 1964, Boneca, 2005, Turner *et al.*, 2014). Das Peptidoglykan besteht aus Glykansträngen, die durch kurze Peptide quervernetzt werden (Gan *et al.*, 2008). Um die strukturelle Integrität und die Erhaltung der Zellform zu gewährleisten, muss die Peptidoglykansynthese und -hydrolyse streng kontrolliert werden (Vollmer und Bertsche, 2008, Typas *et al.*, 2012). Bei Gram-positiven Bakterien besteht das Peptidoglykan aus 10-20 Schichten und weist eine Dicke von über 25 nm auf (Rogers *et al.*, 1980, Scheffers und Pinho, 2005).

Die Glykanstränge bestehen aus N-Acetylglucosamin- und N-Acetylmuraminsäureresten, die über eine β -1 \rightarrow 4-glykosidische Bindung verknüpft werden (Ghuysen, 1968). Die Zusammensetzung der Glykanstränge unterscheidet sich kaum in verschiedenen Organismen (Blumberg und Strominger, 1974, Scheffers und Pinho, 2005).

Der erste Schritt der Peptidoglykansynthese findet im Zytoplasma statt. MurA, eine UDP-N-Acetylglucosamin 1-Carboxyvinyltransferase, überträgt eine Enolpyruvyl-Gruppe von Phosphoenolpyruvat auf UDP-N-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc) (Du *et al.*, 2000, Kock *et al.*, 2004). Dieser Schritt kann durch den Einsatz des Antibiotikums Fosfomycin inhibiert

werden (Abb. 2). Fosfomycin verursacht eine irreversible Alkylierung des Cys115, das sich im aktiven Zentrum von MurA befindet (Bugg, 1999). In Gram-positiven Bakterien, die einen geringen G+C-Gehalt aufweisen, ist neben MurA noch eine weitere UDP-N-Acetylglucosamin 1-Carboxyvinyltransferase, MurZ, vorhanden (Du *et al.*, 2000). In den folgenden Schritten der Peptidoglykansynthese erfolgt die Bildung des UDP-N-Acetylmuramyl-Pentapeptids (UDP-MurNAc-Pentapeptid) durch die Enzyme MurB-F (Abb. 2) (Blumberg und Strominger, 1974, van Heijenoort, 2001, Scheffers und Pinho, 2005). Das Pentapeptid besteht aus D- und L-Aminosäuren und einer dibasischen Aminosäure, die die Bildung der Peptidbrücke ermöglicht. In den meisten Gram-negativen und einigen Gram-positiven Bakterien wird *meso*-Diaminopimelinsäure (*meso*-Dap) ins Pentapeptid eingebaut, bei vielen Gram-positiven wird hingegen L-Lysin verwendet (Ghuysen, 1968, Scheffers und Pinho, 2005). Das Pentapeptid des Peptidoglykans von *L. monocytogenes* ist wie folgt aufgebaut: L-Ala-D-Glu-*meso*-Dap-D-Ala-D-Ala (Navarre und Schneewind, 1999). An der Innenseite der Zytoplasmamembran wird das Phospho-MurNAc-Pentapeptid durch MraY auf den Membranakzeptor Bactoprenol übertragen. Diese Verbindung wird als Lipid I bezeichnet. Zur Bildung von Lipid II wird GlcNAc von UDP-GlcNAc durch MurG auf Lipid I übertragen (Abb. 2) (Scheffers und Pinho, 2005, Pinho *et al.*, 2013). Bactoprenol ist ein Lipidcarrier, der den Transfer von Lipid II durch die hydrophobe Plasmamembran nach außen ermöglicht (Higashi *et al.*, 1967, Scheffers und Pinho, 2005). Dieser Transfer wird über eine Flippase katalysiert. In früheren Arbeiten wurde vermutet, dass RodA und FtsW, zwei integrale Membranproteine, die 10 vorhergesagte Transmembranhelices aufweisen, an diesem Prozess beteiligt sind (Ishino und Matsubashi, 1981, Ishino *et al.*, 1986, Ehlert und Höltje, 1996). Die FtsW-abhängige Lipid II-Translokation konnte *in vitro* unter Verwendung von *E. coli* Membranvesikeln nachgewiesen werden (Mohammadi *et al.*, 2011). Lokalisationsstudien mit GFP-FtsW und RodA-GFP in *Corynebacterium glutamicum* führten zu der Annahme, dass *Corynebacteria* FtsW für die Translokation von Lipid II über die septale Membran benötigen, wohingegen RodA die Translokation über die apikale Membran katalysiert (Sieger *et al.*, 2013). Sham *et al.* identifizierten 2014 MurJ als Lipid II-Flippase in *E. coli*. Aufgrund der essenziellen Funktion von MurJ wird vermutet, dass es sich bei MurJ um die einzige Lipid II-Flippase in diesem Organismus handelt (Sham *et al.*, 2014). In *B. subtilis* konnte neben MurJ noch eine weitere Lipid II-Flippase, Amj, identifiziert werden. Die Translokation von Lipid II durch *B. subtilis* MurJ (YtgP) und Amj (YdaH) konnte *in vivo* bestätigt werden (Meeske *et al.*, 2015). Lipid II dient als Substrat für die Polymerisierung des Glykanstranges. Die Polymerisierung erfolgt an der Außenseite der Zytoplasmamembran und wird durch die

Transglykosylase-Aktivität von Penicillin-bindenden Proteinen (PBPs), in dem Fall von High-molecular-weight PBPs der Klasse A, die im nächsten Kapitel genauer beschrieben werden, katalysiert (Bertsche *et al.*, 2005, Born *et al.*, 2006, Lebar *et al.*, 2013). Durch die Transglykosylierung wird der reduzierte Rest von MurNAc des wachsenden Peptidoglykan-Stranges mit dem C4-Atom des Glucosamin-Restes des Lipid II-Moleküls verbunden. Die Aktivität der Transglykosylase kann durch das Antibiotikum Moenomycin inhibiert werden (Abb. 2) (Huber und Neesemann, 1968, Van Heijenoort *et al.*, 1978, van Heijenoort und van Heijenoort, 1980). Bactoprenol wird nach der Transglykosylierung abgespalten, dephosphoryliert, über die Plasmamembran wieder ins Zellinnere transportiert und kann anschließend für weitere Syntheseschritte genutzt werden (Scheffers und Pinho, 2005).

Die Quervernetzung des Peptidoglykans wird durch die Aktivität von Transpeptidasen katalysiert (Blumberg und Strominger, 1974). Dabei wird D-Ala-D-Ala des Pentapeptids gespalten und die Peptidyl-Einheit auf die Aminogruppe des Akzeptors übertragen. Der Akzeptor ist die dibasische Aminosäure des benachbarten Pentapeptids, im Fall von *L. monocytogenes* meso-Dap (Abb. 2) (Blumberg und Strominger, 1974, Navarre und Schneewind, 1999, Scheffers und Pinho, 2005). Die Disaccharideinheiten der Glykanstränge bilden vermutlich helikale Strukturen aus. Dadurch zeigen die Pentapeptide in alle Richtungen und der Winkel zwischen zwei benachbarten Pentapeptiden beträgt ca. 90° (Labischinski *et al.*, 1985, Koch, 2000). Dadurch befindet sich nur jedes zweite Pentapeptid in einer Ebene und kann quervernetzt werden. In Abhängigkeit von Stamm und Wachstumsbedingungen weist z.B. *B. subtilis* einen Quervernetzungsgrad von 56-63% auf (Atrih *et al.*, 1999). Bei Pentapeptiden, die nicht quervernetzt werden, wird das terminale D-Ala durch eine DD-Carboxypeptidase (DD-CPase) entfernt (Abb. 2) (Araki *et al.*, 1966, Izaki und Strominger, 1968, Scheffers und Pinho, 2005). Dadurch kann die erhaltene Tetrapeptidkette nicht mehr als Donor für die Transpeptidierung genutzt werden (Blumberg und Strominger, 1974). Glykopeptide wie Vancomycin können an das terminale D-Ala des Lipid II-Moleküls und des zuletzt eingebauten Peptidoglykanbausteins binden und dadurch die Quervernetzung verhindern (Perkins, 1969). Die Verwendung eines Fluorescein-markierten Vancomycins, Van-FL, ermöglicht damit die Visualisierung der gerade stattfindenden Peptidoglykansynthese (Daniel und Errington, 2003).

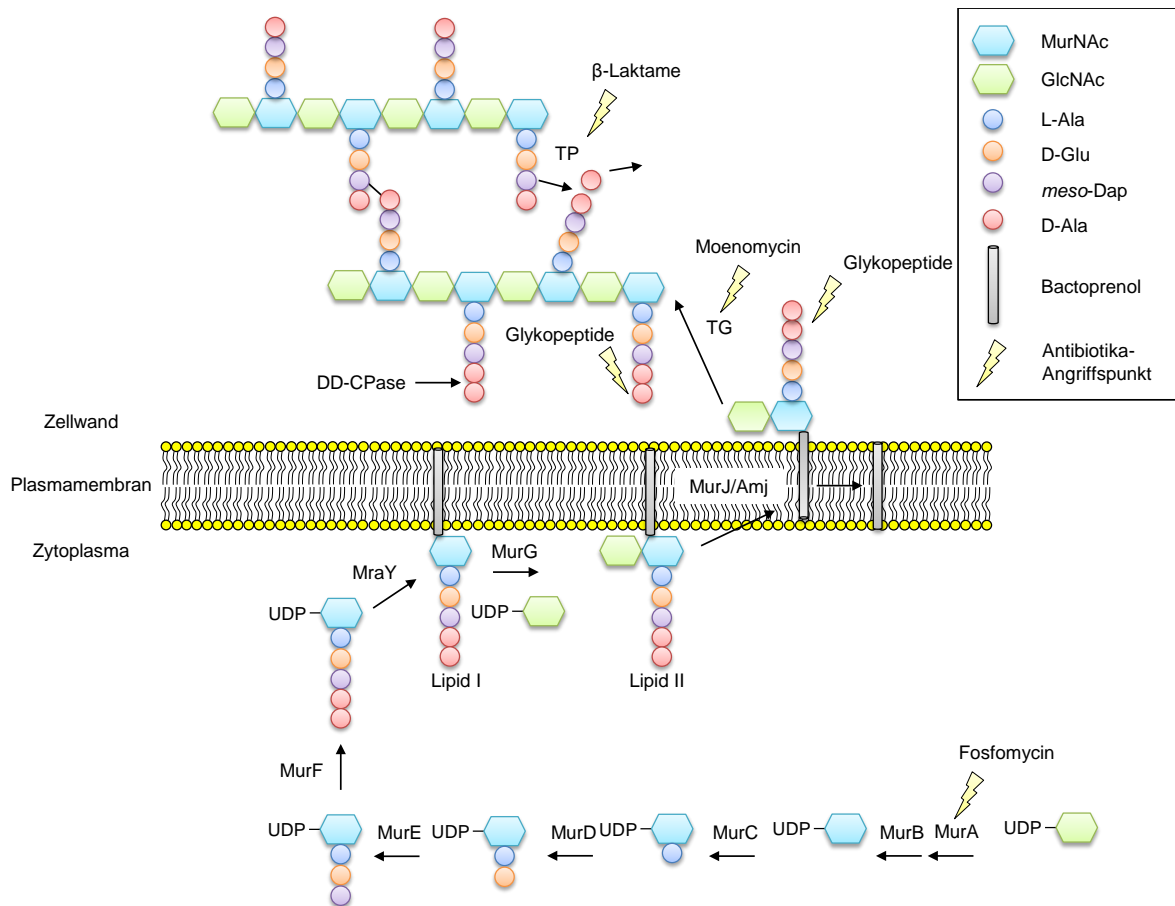


Abb. 2: Ablauf der Peptidoglykansynthese

Die ersten Schritte der Synthese des Peptidoglykans finden im Zytoplasma statt. Durch die Aktivität der Enzyme MurA-F wird das UDP-MurNAc-Pentapeptid gebildet. MurA und MurG katalysieren die Bildung vom Peptidoglykanbaustein Lipid II. Lipid II wird in *B. subtilis* durch die Flippasen MurJ bzw. Amj über die Plasmamembran transportiert. Die Transglykosylase (TG) verknüpft MurNAc des wachsenden Peptidoglykan-Stranges mit dem Lipid II-Molekül. Im nächsten Schritt werden benachbarte Pentapeptide durch die Transpeptidase (TP) quervernetzt. Dazu wird das terminale D-Ala abgespalten und das D-Ala an Position 4 mit *meso*-Dap verbunden. Bei Pentapeptiden, die nicht quervernetzt werden, wird das terminale D-Ala durch eine DD-Carboxypeptidase (DD-CPase) entfernt. Die Angriffspunkte verschiedener Antibiotikaklassen sind eingezeichnet. Modifiziert nach (McCallum *et al.*, 2011, Typas *et al.*, 2012, Pinho *et al.*, 2013).

1.6. Penicillin-bindende Proteine (PBPs)

Für die Behandlung von *Listeria*-Infektionen werden hauptsächlich hohe Dosen von β-Laktam-Antibiotika eingesetzt (Swaminathan und Gerner-Smidt, 2007). Angriffspunkt dieser Antibiotika-Klasse sind Penicillin-bindende Proteine, die den letzten Schritt der Peptidoglykansynthese katalysieren (Nakagawa *et al.*, 1979, Korsak *et al.*, 2010).

PBPs können in zwei Klassen untergliedert werden: High-molecular-weight PBPs (HMW PBPs) und Low-molecular-weight PBPs (LMW PBPs) (Sauvage *et al.*, 2008). HMW PBPs besitzen eine kurze zytoplasmatische Domäne, eine Transmembran-Domäne sowie zwei Domänen, die über einen Linker miteinander verbunden sind und sich im Periplasma befinden (Goffin und Ghuysen, 1998, Macheboeuf *et al.*, 2006, Lovering *et al.*, 2007). Entsprechend

der Funktion der N-terminalen Domäne lassen sich HMW PBPs in Klasse A und Klasse B untergliedern. Die N-terminale Domäne von Klasse A HMW PBPs besitzt eine Transglykosylase-Aktivität, die für die Verlängerung der Glykanstränge verantwortlich ist (Höltje, 1998, Terrak *et al.*, 1999, Sauvage *et al.*, 2008). Dahingegen scheint die N-terminale Domäne der Klasse B HMW PBPs an der Zellmorphogenese durch die Interaktion mit Zellteilungsproteinen, wie FtsN, FtsW und FtsQ, beteiligt zu sein (Goffin und Ghuysen, 1998, Di Lallo *et al.*, 2003, Karimova *et al.*, 2005, den Blaauwen *et al.*, 2008, Zapun *et al.*, 2008a, van der Ploeg *et al.*, 2013). Die C-terminale Domäne beider HMW PBP Klassen besitzt eine Transpeptidase-Aktivität, die die Quervernetzung benachbarter Glykanstränge katalysiert (Goffin und Ghuysen, 1998, Sauvage *et al.*, 2008, Zapun *et al.*, 2008a). Da die HMW PBPs der Klasse A sowohl Transglykosylase- als auch Transpeptidase-Aktivität aufweisen, werden sie auch als bi-funktionale PBPs bezeichnet, Klasse B HMW PBPs sind hingegen monofunktionale PBPs.

HMW PBPs sind am Zellwachstum und der Septenbildung beteiligt und prägen damit die Zellmorphologie (Matsushashi *et al.*, 1990, Wientjes und Nanninga, 1991). LMW PBPs sind DD-Peptidasen, die meist eine DD-Carboxypeptidase- oder Endopeptidase-Aktivität aufweisen. Sie sind für die Zellseparation und die Reifung des Peptidoglykans und damit für die Morphologie der Zellen verantwortlich (Sauvage *et al.*, 2008, Gonzalez-Leiza *et al.*, 2011, Brambilla *et al.*, 2014). Weiterhin kontrollieren sie den Grad der Quervernetzung des Peptidoglykans durch Hydrolyse des terminalen D-Ala der Pentapeptide, wodurch die Quervernetzung inhibiert wird, oder durch Hydrolyse bestehender Quervernetzungen zwischen zwei Pentapeptiden (Ghuysen, 1991, Massova und Mobashery, 1998, Meberg *et al.*, 2004, Vollmer und Höltje, 2004, Vollmer *et al.*, 2008). Die Inhibierung der HMW PBPs durch β -Laktame wie Penicillin erfolgt durch eine kovalente Bindung mit dem Serin des aktiven Zentrums der Transpeptidase. Penicillin weist eine strukturelle Ähnlichkeit mit dem Substrat der Transpeptidase, dem D-Ala-D-Ala des Lipid II, auf und kann dadurch von der Transpeptidase gebunden werden (Tipper und Strominger, 1965, Lee *et al.*, 2001, Lee *et al.*, 2003, Macheboeuf *et al.*, 2006).

Die Inhibierung der Transpeptidase von PBP 1A in *E. coli*, einem bi-funktionalen PBP, führte zur Synthese längerer Glykanstränge und infolge dessen zum Verbrauch von Lipid II-Molekülen (Barrett *et al.*, 2007). Mutationen im aktiven Zentrum der Transpeptidase von PBP 1A in *E. coli* führten ebenfalls zur Synthese von Glykansträngen, die keine Quervernetzung aufwiesen. Dahingegen führte die Inaktivierung der Transglykosylase von PBP 1A durch Mutationen im aktiven Zentrum zur Akkumulation von Lipid II-Molekülen (Born *et al.*,

2006). Dieser Effekt konnte auch für *E. coli* PBP 1B gezeigt werden (Terrak *et al.*, 1999). Die Transglykosylase und Transpeptidase der bi-funktionalen PBPs sind somit gekoppelt. Der wachsende Glykanstrang, der durch die Transglykosylase gebildet wird, dient der Transpeptidase als Donor für die Quervernetzung (Sung *et al.*, 2009). Das bedeutet, dass die Transglykosylierung auch ohne Transpeptidierung erfolgen kann. Im Gegensatz dazu konnte eine Transpeptidierung ohne vorherige Bildung von Glykansträngen nicht nachgewiesen werden (Rogers *et al.*, 1980, Ward, 1984, Kohlrausch und Höltje, 1991, Banzhaf *et al.*, 2012). Aufgrund der Bindung von Penicillin an die Transpeptidase-Domäne der PBPs war es möglich, Penicillin-bindende Proteine unter Verwendung eines radioaktiv-markierten Penicillins nachzuweisen. Vicente und Kollegen gelang es erstmals 5 PBPs in *L. monocytogenes*, PBP1-5, mit Hilfe dieser Methode nachzuweisen (Vicente *et al.*, 1990). Als Glaser *et al.* 2001 die Genomsequenz von *L. monocytogenes* EGD-e veröffentlichten (Glaser *et al.*, 2001), konnten insgesamt 5 HMW PBPs und 5 LMW PBPs identifiziert werden (Guinane *et al.*, 2006, Bierne und Cossart, 2007, Korsak *et al.*, 2010). Infolge verschiedener Deletions- und Überexpressionsstudien wurden die PBPs von *L. monocytogenes* umbenannt, beispielsweise PBP3 in PBP B1 (Krawczyk-Balska *et al.*, 2012) oder PBP4 in PBP A2 (Zawadzka-Skomial *et al.*, 2006, Van de Velde *et al.*, 2009). Zur Charakterisierung der HMW PBPs wurden Disruptionsmutanten unter Verwendung eines temperatursensitiven Plasmides hergestellt (Guinane *et al.*, 2006). Die Ergebnisse von Guinane *et al.* wiesen hierbei auf eine Essentialität von PBP2 (neue Bezeichnung PBP B2) hin. Weiterhin wurde vermutet, dass die verschiedenen PBPs überlappende Funktionen aufweisen und daher die phänotypischen Veränderungen infolge der Disruption einzelner PBPs gering sind (Guinane *et al.*, 2006). In früheren Arbeiten wurde vermutet, dass es sich bei PBP B1 um den Hauptangriffspunkt von Penicillin handeln könnte (Gutkind *et al.*, 1990, Pierre *et al.*, 1990, Vicente *et al.*, 1990).

1.7. Zellteilung und laterales Zellwachstum

Neben der strikten Kontrolle der Peptidoglykansynthese und –hydrolyse müssen auch die Prozesse der Zellteilung und des lateralen Zellwachstums streng reguliert sein. In stäbchenförmigen Bakterien umfasst die Synthese der Zellwand zwei Prozesse: das Zellwachstum und die Zellteilung (Lederberg, 1957, Schwarz *et al.*, 1969, Lleo *et al.*, 1990, Höltje, 1998). Diese Prozesse werden durch die Anwesenheit von zellwachstums- und zellteilungsspezifischen makromolekularen Komplexen gesteuert (Ricard und Hirota, 1973, Nanninga, 1991, Carballido-Lopez und Formstone, 2007). In *E. coli* und *B. subtilis* konnten PBPs identifiziert werden, die nur für das Zellwachstum oder nur für die Zellteilung

verantwortlich sind (Spratt, 1975, Yanouri *et al.*, 1993, Wei *et al.*, 2003, Scheffers und Errington, 2004). Frühere Arbeiten zeigten, dass die Aktivierung der Synthese des Septums abhängig von der Aktivierung der Zellteilungskaskade durch das Tubulin-Homolog FtsZ ist und mit der Reduktion der Synthese der lateralen Zellwand einhergeht (Begg und Donachie, 1985, Woldringh *et al.*, 1987, Cooper und Hsieh, 1988, Scheffers und Pinho, 2005). Während der Zellteilung lagern sich FtsZ-Monomere zu Polymeren zusammen und bilden eine ringähnliche Struktur in der Zellmitte, den Z-Ring, der zur Rekrutierung weiterer Zellteilungsproteine zum Septum gebraucht wird (Bi und Lutkenhaus, 1991, Errington *et al.*, 2003). Dieser aus FtsZ und weiteren Zellteilungsproteinen bestehende Proteinkomplex, der an der Initiation der Zellteilung, der Septenbildung und der Trennung der Tochterzellen beteiligt ist, wird als Divisom bezeichnet (Adams und Errington, 2009). Die Zusammensetzung des Divisoms unterscheidet sich in den verschiedenen Organismen. Das Divisom von *B. subtilis* wird aus den Proteinen FtsZ, FtsA, SepF, ZapA, FtsW, MurJ/Amj, DivIB, DivIC, FtsL, PBP 1, PBP 2b, EzrA, DivIVA und GpsB gebildet (Abb. 3) (Carballido-Lopez und Formstone, 2007, Sham *et al.*, 2014, Meeske *et al.*, 2015). Die Funktion der einzelnen *B. subtilis* Zellteilungsproteine und die Gene, die diese Proteine in *L. monocytogenes* codieren, sind in Tab. 1 zusammengefasst. Gamba *et al.* konnten zeigen, dass FtsZ, FtsA, ZapA und EzrA zu Beginn der Zellteilung in der Zellmitte lokalisiert sind, wohingegen FtsW, DivIB, FtsL, PBP 2b, DivIVA und GpsB erst zu einem späteren Zeitpunkt in der Zellmitte detektiert werden können (Gamba *et al.*, 2009). Nach vollständiger Synthese der Zellwand wird das Peptidoglykan des gebildeten Septums, das den Zellpolen der Tochterzellen entspricht, zu inertem Peptidoglykan differenziert, d. h. es findet kein neuer Einbau und kein Abbau von Peptidoglykanbausteinen an den Zellpolen statt (Cole und Hahn, 1962, Burman *et al.*, 1983, Mobley *et al.*, 1984, Egan und Vollmer, 2013).

Tab. 1: Zellteilungsproteine in *B. subtilis* und deren Funktion

Protein	Gene in <i>L. monocytogenes</i>	Funktion	Referenz
FtsZ	<i>lmo2032</i>	Bildung des Z-Rings zur Initiation der Zellteilung	(Bi und Lutkenhaus, 1991)
FtsA	<i>lmo2033</i>	Bindung von FtsZ an der Membran und Destabilisierung der FtsZ-Filamente	(Jensen <i>et al.</i> , 2005, Loose und Mitchison, 2014)
SepF	<i>lmo2030</i>	Erhöht Bündelung der FtsZ-Filamente und stabilisiert diese FtsZ-Bündel, suppressiert GTPase-Aktivität von FtsZ	(Hamoen <i>et al.</i> , 2006, Duman <i>et al.</i> , 2013)

Protein	Gene in <i>L. monocytogenes</i>	Funktion	Referenz
ZapA	<i>lmo1229</i>	Stabilisierung der FtsZ-Filamente	(Gueiros-Filho und Losick, 2002)
FtsW	<i>lmo1071, lmo2688</i>	Transfer von Lipid II über die Zytoplasmamembran nach außen	(Mohammadi <i>et al.</i> , 2011, Sieger <i>et al.</i> , 2013)
MurJ/Amj	<i>lmo1625, lmo1624</i> (MurJ-Homologe)	Transfer von Lipid II über die Zytoplasmamembran nach außen	(Sham <i>et al.</i> , 2014, Meeske <i>et al.</i> , 2015)
DivIB	<i>lmo2034</i>	Fördert Bildung des DivIB-DivIC-FtsL-Komplexes	(Noirclerc-Savoye <i>et al.</i> , 2005, Daniel <i>et al.</i> , 2006, Masson <i>et al.</i> , 2009)
DivIC	<i>lmo0217</i>	Rekrutierung von Proteinen, die zu späteren Zeitpunkten an Septum lokalisieren wie PBP 2b	(Daniel und Errington, 2000, Daniel <i>et al.</i> , 2000, Daniel <i>et al.</i> , 2006)
FtsL	<i>lmo2040</i>	Siehe DivIC	siehe DivIC
PBP 1	<i>lmo1892</i>	Transpeptidase und Transglykoylase, Synthese des Peptidoglykans an Septum und lateraler Zellwand	(Popham und Setlow, 1995, Pedersen <i>et al.</i> , 1999)
PBP 2b	<i>lmo2039</i>	Transpeptidase, essenziell für Synthese des Peptidoglykans des Septums	(Yanouri <i>et al.</i> , 1993, Daniel <i>et al.</i> , 1996, Daniel <i>et al.</i> , 2000)
EzrA	<i>lmo1594</i>	Negativer Regulator der Z-Ringbildung, Rekrutierung von PBP 1 zum Septum	(Levin <i>et al.</i> , 1999, Claessen <i>et al.</i> , 2008)
DivIVA	<i>lmo2020</i>	Rekrutierung der Min-Proteine (MinCDJ) zum Septum	(Cha und Stewart, 1997, Edwards und Errington, 1997, Marston <i>et al.</i> , 1998, Bramkamp <i>et al.</i> , 2008, Patrick und Kearns, 2008, Bramkamp und van Baarle, 2009)
GpsB	<i>lmo1888</i>	Kontrolliert subzelluläre Lokalisation von PBP 1 während Zellwandsynthese	(Claessen <i>et al.</i> , 2008, Tavares <i>et al.</i> , 2008)

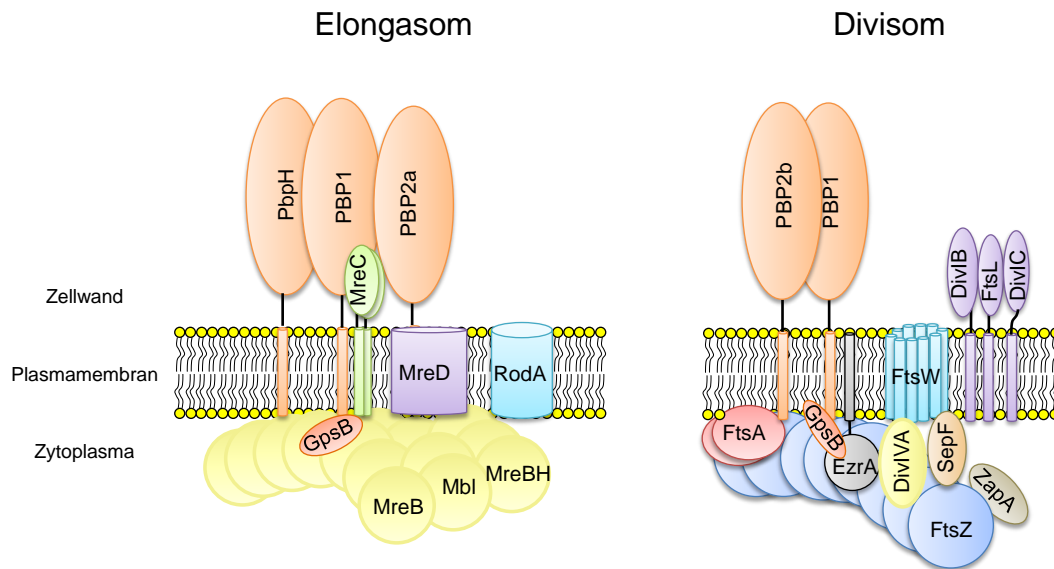


Abb. 3: Aufbau des Elongasoms und des Divisoms

Schematische Darstellung des *B. subtilis* Elongasoms (links), das für das Zellwachstum verantwortlich ist, und des *B. subtilis* Divisoms (rechts), das die Zellteilung vermittelt. Modifiziert nach (Carballido-Lopez und Formstone, 2007, Claessen *et al.*, 2008, Adams und Errington, 2009). MurJ und Amj wurden in dieser Abbildung nicht dargestellt, da es bislang noch keine Lokalisationsdaten gibt.

Verschiedene Autoren beschreiben, dass sich das Aktin-ähnliche Protein MreB zu membran-assoziierten helikalen Filamenten zusammenlagert und als Gerüst für Proteine dienen könnte, die an der Zellwandsynthese beteiligt sind (Jones *et al.*, 2001, Daniel und Errington, 2003, Figge *et al.*, 2004, Formstone und Errington, 2005). Durch den Einsatz von hochauflösenden Mikroskopie-Techniken wie der konfokalen Mikroskopie oder der Internen Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, dass die MreB-Filamente in *E. coli*, *Caulobacter crescentus* und *B. subtilis* im rechten Winkel zur Längsachse der Zelle angeordnet sind und sich kreisförmig um die Zelle bewegen (Dominguez-Escobar *et al.*, 2011, Garner *et al.*, 2011, van Teeffelen *et al.*, 2011). Die Rotation der MreB-Filamente um die Zelle ist abhängig von der lateralen Zellwandsynthese, da die Deletion und Depletion der zellwachstumsspezifischen Proteine PbpH, PBP 2a, MreC und MreD die MreB-Bewegung verlangsamen oder vollständig inhibieren. Die Inhibierung des Lipid II-Einbaus in das Peptidoglykan durch Vancomycin oder die Inhibierung von MurA durch Fosfomycin hatte den gleichen Effekt auf die MreB-Bewegung (Dominguez-Escobar *et al.*, 2011, Garner *et al.*, 2011, van Teeffelen *et al.*, 2011). MreB ist im *mreBCD*-Operon codiert. Wachi *et al.* und weitere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass MreBCD für das stäbchenförmige Wachstum von *E. coli* und *B. subtilis* notwendig sind (Wachi *et al.*, 1987, Doi *et al.*, 1988, Wachi *et al.*, 1989, Levin *et al.*, 1992, Varley und Stewart, 1992). Zudem sind die MreBCD-Proteine in der Regel in kokkoiden Zellen nicht vorhanden (Jones *et al.*, 2001, Daniel und Errington, 2003). *B. subtilis* besitzt drei Aktin-Isoformen: MreB, Mbl und MreBH, die für die Koordination der

lateralen Zellwandsynthese eine essenzielle Rolle spielen (Jones *et al.*, 2001, van den Ent *et al.*, 2001, Carballido-Lopez *et al.*, 2006). MreB kontrolliert die Zelldicke, begrenzt die Bewegung des Zellwachstumskomplexes und steuert die korrekte Orientierung der Bewegung (Doi *et al.*, 1988, Wachi und Matsubishi, 1989, Jones *et al.*, 2001, Formstone und Errington, 2005, Dominguez-Escobar *et al.*, 2011). Mbl hat einen Einfluss auf den Einbau von Lipid II in die laterale Zellwand und MreBH kontrolliert möglicherweise die Autolyse-Aktivität während der lateralen Zellwandsynthese durch die Positionierung der DL-Endopeptidase LytE (Abhayawardhane und Stewart, 1995, Jones *et al.*, 2001, Carballido-Lopez und Errington, 2003, Daniel und Errington, 2003, Carballido-Lopez *et al.*, 2006).

Die Proteine MreC und MreD bestimmen ebenfalls die Zellform stäbchenförmiger Bakterien wie *E. coli* und *B. subtilis* und beeinflussen die laterale Zellwandsynthese durch die Interaktion mit MreB (Levin *et al.*, 1992, Varley und Stewart, 1992, Lee und Stewart, 2003, Soufo und Graumann, 2003, Kruse *et al.*, 2005, Leaver und Errington, 2005). Zudem interagieren MraY und MurG, die an der Zellwandsynthese beteiligt sind (Abb. 2), mit MreB, MreD und FtsZ in *E. coli* und *C. crescentus* (Aaron *et al.*, 2007, Mohammadi *et al.*, 2007, White *et al.*, 2010). Bacterial Two-Hybrid-Assays mit *B. subtilis* MreC wiesen auf Interaktionen mit den HMW PBPs der Klasse A und B hin (van den Ent *et al.*, 2006). Zudem postulierten Leaver und Errington sowie Kruse *et al.* die Bildung eines Komplexes aus MreBCD, Penicillin-bindenden Proteinen und RodA, der möglichen Lipid II-Translokase (Kruse *et al.*, 2005, Leaver und Errington, 2005, Sieger *et al.*, 2013). Der Komplex aus diesen Proteinen wird als Elongasom bezeichnet (Abb. 3).

1.8. DivIVA-Proteinfamilie

1.8.1. DivIVA

DivIVA-Proteine sind hochkonservierte Zellteilungsproteine der Gram-positiven Bakterien, die an negativ gekrümmten (konkaven) Membranen akkumulieren (Lenarcic *et al.*, 2009, Ramamurthi und Losick, 2009, Eswaramoorthy *et al.*, 2011). Negativ gekrümmte Membranen sind an den Zellpolen und an den Septen zu finden. *B. subtilis* DivIVA bildet eine ringartige Struktur auf beiden Seiten des Septums, sobald die Einschnürung des Z-Ringes beginnt und dort während der Zellteilung erhalten bleibt (Edwards und Errington, 1997, Harry und Lewis, 2003, Eswaramoorthy *et al.*, 2011). Nach der Separierung der Tochterzellen bekommen die neu entstandenen Zellpole eine halbrunde Form. Infolge der daraus resultierenden Reduktion der negativen Krümmung nimmt der Durchmesser des DivIVA-Rings sukzessive ab (Eswaramoorthy *et al.*, 2011).

1.8.1.1. Struktur von DivIVA

DivIVA-Proteine bestehen aus einer N-terminalen und C-terminalen Domäne, die über eine Linker-Region mit variierender Länge verbunden sind (Oliva *et al.*, 2010). Die N-terminale Domäne von DivIVA aus *B. subtilis* weist eine amphipathische α -Helix auf und bildet ein coiled-coil Dimer, das eine parallele Anordnung aufweist und für die Lipidbindung verantwortlich ist (Lenarcic *et al.*, 2009). Daher wird sie auch als Lipidbindedomäne (LBD) bezeichnet. Die beiden N-Termini der DivIVA-Monomere sind ineinander verdreht. Dadurch werden die Seitenketten zweier Phenylalanine (F17 in *B. subtilis*, eins je Monomer) nach außen gerichtet, die essenziell für die Interaktion mit der hydrophoben Zellmembran sind (Oliva *et al.*, 2010). Die Aminosäuren K15 und R18 von *B. subtilis* DivIVA stabilisieren die Interaktion mit der negativ geladenen Oberfläche der Zellmembran (Oliva *et al.*, 2010). In DivIVA-Proteinen anderer Firmicutes können die Aminosäuren, die die Interaktion stabilisieren, variieren. Phenylalanin und Arginin können in nah verwandten Organismen durch Leucin und Methionin bzw. Lysin ersetzt sein (Oliva *et al.*, 2010, Sieger und Bramkamp, 2014). Die C-terminale Domäne von DivIVA ist weniger stark konserviert. In *B. subtilis* bildet der C-Terminus eine tetramere Struktur mit mehreren coiled-coil Regionen, die an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sind (Oliva *et al.*, 2010, Donovan *et al.*, 2012, van Baarle *et al.*, 2013). Dieses Tetramer wird aus zwei Dimeren gebildet, die antiparallel ausgerichtet sind. Dadurch weist das vollständige DivIVA-Tetramer von *B. subtilis* eine Länge von ca. 30 nm auf. Die antiparallele Anordnung von zwei DivIVA-Dimeren im DivIVA-Tetramer ermöglicht so die Verbindung zweier Membranen über die LBD der parallel angeordneten N-Termini (Lenarcic *et al.*, 2009, Oliva *et al.*, 2010). Die LBD von DivIVA ist somit für die Dimerisierung, Lipidbindung und Lokalisation von DivIVA verantwortlich, der C-Terminus ermöglicht hingegen die Tetramerisierung des Proteins. Die LBD und die C-terminale Domäne dienen darüber hinaus zur Interaktion mit unterschiedlichen Proteinen (Donovan *et al.*, 2012, van Baarle *et al.*, 2013).

1.8.1.2. Funktion von DivIVA in verschiedenen Spezies

B. subtilis ist ein sporenbildendes Bakterium. Während der Sporulation lokalisiert DivIVA an den Zellpolen und verbindet SpoIIE mit der Zellmembran (Eswaramoorthy *et al.*, 2014). SpoIIE ist verantwortlich für die Rekrutierung von FtsZ zu den Zellpolen, wird nach der Bildung des Septums in die Endospore entlassen und aktiviert den Transkriptionsfaktor σ^F (Gholamhoseinian *et al.*, 1992, Gonzy-Treboul *et al.*, 1992, Barak und Youngman, 1996, Feucht *et al.*, 1996, Khvorova *et al.*, 1998, Ben-Yehuda und Losick, 2002, Eswaramoorthy *et*

al., 2014). Darüber hinaus interagiert der C-Terminus von *B. subtilis* DivIVA mit dem DNA-bindenden Protein RacA (van Baarle *et al.*, 2013), das für die Chromosomensegregation während der Sporulation verantwortlich ist (Ben-Yehuda *et al.*, 2003, Wu und Errington, 2003). Während der Chromosomensegregation ermöglicht DivIVA so die Positionierung der *oriC*-Region des Chromosoms am Zellpol der Vorspore (Thomaides *et al.*, 2001). DivIVA beeinflusst auch in *Streptococcus pneumoniae* und *Enterococcus faecalis* die Chromosomensegregation, die Zellteilung und die Zellmorphologie (Fadda *et al.*, 2003, Ramirez-Arcos *et al.*, 2005, Fadda *et al.*, 2007, Fleurie *et al.*, 2014). Die Deletion von *divIVA* in *S. pneumoniae* führt zur Bildung von Zellketten (Fadda *et al.*, 2003). DivIVA interagiert zudem mit einigen Peptidoglykanhydrolasen, z.B. PcsB und LytB in Pneumokokken (Fadda *et al.*, 2007, Vicente und Garcia-Ovalle, 2007, Giefing-Kroll *et al.*, 2011, Boersma *et al.*, 2015). In Abwesenheit von DivIVA werden diese Hydrolasen nicht mehr richtig positioniert, was zu einem Defekt in der Separation der Tochterzellen führt. Viele Zellen weisen zudem keine DNA auf (Fadda *et al.*, 2003). Die Funktion von DivIVA im pathogenen Bakterium *Staphylococcus aureus* ist bislang noch nicht bekannt. Die Deletion von *divIVA* hat in diesem Organismus keinen Einfluss auf die Zellmorphologie, das Wachstum oder die Chromosomensegregation (Pinho und Errington, 2004). Im Gegensatz dazu ist *divIVA* in *E. faecalis* essenziell und kann nicht deletiert werden. Die Depletion von *divIVA* resultiert in diesem Bakterium in der Bildung von verlängerten Zellen mit veränderter Zellform und der Bildung von Zellclustern (Ramirez-Arcos *et al.*, 2005). *E. faecalis* stellt somit den bislang einzig bekannten Vertreter der Firmicutes dar, bei dem DivIVA eine Funktion aufweist, die essenziell für die Lebensfähigkeit des Bakteriums ist. Darüber hinaus ist DivIVA (Wag31) in den meisten Vertretern der Aktinobakterien, z.B. *Mycobacterium tuberculosis*, *M. smegmatis*, *C. glutamicum* und *Streptomyces coelicolor*, ebenfalls essenziell (Flärdh, 2003, Ramos *et al.*, 2003, Kang *et al.*, 2008). Das Zellwachstum in Aktinobakterien erfolgt nicht durch laterale Zellwandsynthese, sondern durch die Synthese von Peptidoglykan an den Zellpolen. In den genannten Aktinobakterien kontrolliert DivIVA die Zellmorphologie und beeinflusst das polare Wachstum. DivIVA ist in den Aktinobakterien hauptsächlich an den Zellpolen und nur teilweise am Septum lokalisiert (Flärdh, 2003, Ramos *et al.*, 2003, Kang *et al.*, 2008, Letek *et al.*, 2008). Die Abwesenheit von Wag31, dem DivIVA-Homolog in den Mykobakterien, äußert sich in *M. smegmatis* im sogenannten bulging Phänotyp, d.h. das einer der beiden Zellpole geschwollen ist und nicht mehr die normale Stäbchenform aufweist (Kang *et al.*, 2008). In *C. glutamicum* führt die Depletion von DivIVA zu einem Defekt im Zellwachstum, was die Bildung kokkoider Zellen zur Folge hat (Letek *et al.*, 2008). Zudem wird die

Chromosomensegregation in *C. glutamicum* durch die Interaktion von DivIVA mit ParB beeinflusst (Donovan *et al.*, 2012). Im Gegensatz dazu führt die Depletion von DivIVA in *S. coelicolor* zur Ausbildung gekrümmter und ineinander verdrehter Hyphen (Flärdh, 2003). Dabei werden nicht nur laterale Verzweigungen gebildet, sondern auch Verzweigungen an der Spitze der Hyphen. Die Überexpression von *divIVA* in *C. glutamicum* und *S. coelicolor* führt hingegen zur Bildung geschwollener Zellen mit asymmetrischer Zellform (Flärdh, 2003, Letek *et al.*, 2008). Zusätzlich wird eine gesteigerte Bildung von Verzweigungen der Hyphen in *S. coelicolor* beobachtet, was als hyperbranching bezeichnet wird (Flärdh, 2003).

In *B. subtilis*, einem Vertreter der Firmicutes, resultiert die Deletion von *divIVA* in der Verlängerung der Zellen und in der Bildung von Minizellen, letztere enthalten keine DNA (Cha und Stewart, 1997, Edwards und Errington, 1997). Dahingegen äußert sich die Deletion von *divIVA* im nah verwandten Bakterium *L. monocytogenes* in der Bildung von langen Zellketten. Die Zellen können zwar ein Septum bilden, sich nach Beendigung der Zellteilung jedoch nicht separieren (Halbedel *et al.*, 2012). In der *L. monocytogenes* $\Delta divIVA$ -Mutante ist die Lokalisation der beiden Autolysine p60 (codiert durch *iap*) und MurA (NamA) gestört. Dies führt zu einer reduzierten Sekretion dieser Autolysine (Halbedel *et al.*, 2012). P60 und MurA sind Substrate der akzessorischen ATPase SecA2 (Lenz *et al.*, 2003, Machata *et al.*, 2005). Die Deletion von *secA2* in *L. monocytogenes* führt wie auch die Deletion von *divIVA* zur Bildung von Zellketten, die sich nicht trennen können (Lenz und Portnoy, 2002, Machata *et al.*, 2005). Die Autolysine p60 und MurA, die die Trennung der Tochterzellen ermöglichen, werden somit durch DivIVA zum Septum rekrutiert und durch SecA2 sekretiert (Halbedel *et al.*, 2012).

Die Deletion von *L. monocytogenes divIVA* führt neben dem Defekt in der Proteinsekretion auch zu einem Zellteilungsdefekt. Kaval *et al.* konnten eine Interaktion von DivIVA mit MinD und MinJ in Bacterial Two-Hybrid-Assays und Pull-down-Experimenten nachweisen (Kaval *et al.*, 2014). Im Gegensatz dazu konnte in *B. subtilis* keine direkte Interaktion zwischen DivIVA und MinD nachgewiesen werden (Bramkamp *et al.*, 2008, Bramkamp und van Baarle, 2009). Das Transmembranprotein MinJ, das mit der LBD von *B. subtilis* DivIVA interagiert (van Baarle *et al.*, 2013), wird von DivIVA rekrutiert und ermöglicht erst die Interaktion von MinCD und DivIVA (Bramkamp *et al.*, 2008, Patrick und Kearns, 2008, Bramkamp und van Baarle, 2009). Das Min-System verhindert die FtsZ-Ringbildung in der Nähe der neu entstandenen Zellpole (Margolin, 2001, Hale und de Boer, 2002). MinC ist ein FtsZ-Inhibitor, dessen Aktivität von MinD, einer membranassoziierten ATPase, kontrolliert wird (Marston *et al.*, 1998, Marston und Errington, 1999). Untersuchungen zur Lokalisation

von MinC-GFP, GFP-MinD und MinJ-GFP in Abhängigkeit von DivIVA ergaben, dass DivIVA in *L. monocytogenes* für die Rekrutierung von MinC und MinD zum Septum verantwortlich ist, die Lokalisation von MinJ an das Septum war DivIVA-unabhängig (Kaval *et al.*, 2014). Zudem ist die Bildung der Z-Ringe zur Initiation der Zellteilung abhängig von DivIVA, MinCD und MinJ (Kaval *et al.*, 2014).

In *B. subtilis* konnte zudem ein Einfluss von DivIVA auf die Kompetenz, also die Aufnahme von DNA, nachgewiesen werden. Dazu interagiert DivIVA mit dem kompetenzspezifischen Zellteilungsinhibitor Maf und dem Kompetenzregulator ComN und rekrutiert vermutlich beide Proteine zum Zellpol (Briley *et al.*, 2011, dos Santos *et al.*, 2012).

Des Weiteren führt die Deletion von *divIVA* zu einer eingeschränkten Motilität von *B. subtilis* (Patrick und Kearns, 2008). In *L. monocytogenes* konnte neben einer gestörten Motilität auch ein Defekt in der Biofilmbildung festgestellt werden, obwohl Flagellen an der Oberfläche der Zellen nachweisbar sind (Halbedel *et al.*, 2012). Demnach scheint DivIVA in *B. subtilis* und *L. monocytogenes* für die Motilität wichtig zu sein (Patrick und Kearns, 2008, Halbedel *et al.*, 2012). In verschiedenen Infektionsexperimenten wurde gezeigt, dass die Deletion von *divIVA* zu einer starken Reduktion der Invasivität und der Zell-zu-Zellausbreitung von *L. monocytogenes* führt (Halbedel *et al.*, 2012). DivIVA ist somit in Prozessen der Zellteilung, des Zellwachstums und der Peptidoglykansynthese involviert und sogar essenziell für die Virulenz pathogener Bakterien wie *L. monocytogenes*.

1.8.2. GpsB

In Firmicutes wie *B. subtilis*, *S. pneumoniae* und *S. aureus* ist ein DivIVA-Paralog namens GpsB (YpsB) codiert, welches in den Gram-positiven Bakterien mit hohem G+C-Gehalt (Aktinobakterien) nicht vorkommt (Massidda *et al.*, 1998, Claessen *et al.*, 2008, Tavares *et al.*, 2008). Der N-Terminus von GpsB bildet wie in DivIVA eine parallel-angeordnete coiled-coil-Struktur, der sich die Linker-Region und eine Prolin-reiche Region anschließt. Die Prolin-reiche Region umfasst in *B. subtilis* GpsB die Aminosäuren 66-75 und ist in DivIVA-Homologen nicht vorhanden. Der C-Terminus der GpsB-Proteine stellt einen hochkonservierten Bereich dar, der jedoch deutlich kürzer ist als in DivIVA-Proteinen (Claessen *et al.*, 2008) (Tavares *et al.*, 2008). Diese strukturellen Unterschiede zwischen GpsB- und DivIVA-Proteinen werden in Abb. 4 deutlich, die ein Sequenzalignement dieser Proteine aus verschiedenen Firmicutes zeigt.

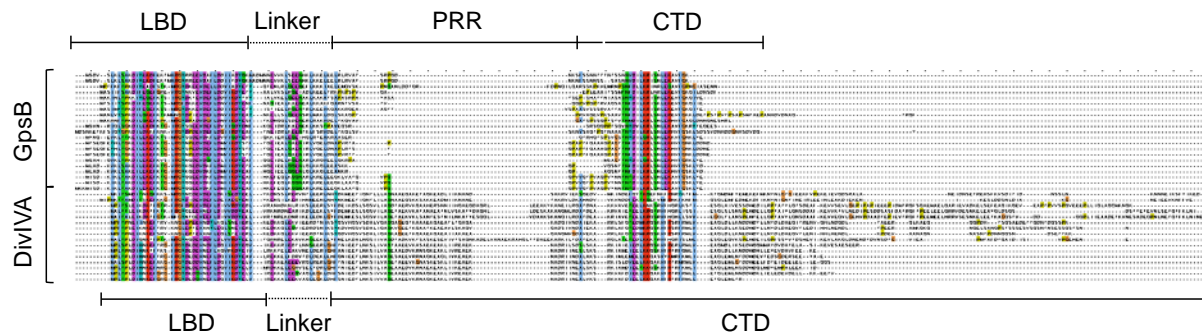


Abb. 4: Sequenzalignement von GpsB- und DivIVA-Proteinen aus *L. monocytogenes* und weiteren Firmicutes

GpsB-Proteine bestehen aus einer stark konservierte N-terminalen Lipidbindedomäne (LBD), gefolgt von einer Linker-Region mit variabler Länge. Die Prolin-reiche Region (PRR) verbindet die Linker-Region mit der C-terminalen Domäne (CTD) der GpsB-Proteine. Im Gegensatz dazu besitzen DivIVA-Proteine keine PRR. Die LBD und CTD werden über die Linker-Region verbunden. Darüber hinaus weisen DivIVA-Proteine eine verlängerte CTD auf. Das Sequenzalignement wurde mit dem Programm Clustal Omega erstellt (Sievers *et al.*, 2011). Eine vergrößerte Darstellung des Sequenzalignments ist im Anhang zu finden (Abb. A1).

1.8.2.1. GpsB in *B. subtilis*

Bislang ist die Funktion von GpsB lediglich in den Firmicutes *B. subtilis* und *S. pneumoniae* näher untersucht. Die Deletion von *gpsB* in *B. subtilis* hatte unter normalen Bedingungen keinen Einfluss auf das Wachstum, die Sporulation und die Morphologie des Stammes (Claessen *et al.*, 2008, Tavares *et al.*, 2008). In Microarrays konnte eine erhöhte Expression von *gpsB* bei Wachstum von *B. subtilis* unter Salzstress nachgewiesen werden (Steil *et al.*, 2003). Bei Salzkonzentrationen über 0,6 M bildete die *B. subtilis* Δ *gpsB*-Deletionsmutante verlängerte Zellen, die teilweise geschwollene Zellpole aufwiesen und lysierten (Claessen *et al.*, 2008). Phosphoproteom-Analysen haben gezeigt, dass *B. subtilis* GpsB und auch DivIVA phosphoryliert werden (Macek *et al.*, 2007, Ravikumar *et al.*, 2014). Die Serin-Threonin-Kinase PrkC phosphoryliert *B. subtilis* GpsB an Position Thr75, wodurch die Autophosphorylierung und die Aktivität von PrkC inhibiert wird. Die Phosphorylierung von GpsB reguliert somit die Aktivität von PrkC über einen negativen Feedback-Loop. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der Wachstumsdefekt der *B. subtilis* Δ *gpsB*-Mutante bei hohen Salzkonzentrationen von PrkC abhängig ist (Pompeo *et al.*, 2015).

Claessen *et al.* identifizierten *gpsB* während eines Screenings nach Mutationen, die sich in einer Δ *ezrA*-Deletionsmutante in einer sogenannten synthetic sickness oder synthetic lethality äußern (Claessen *et al.*, 2008). EzrA, ein integrales Membranprotein, ist ein negativer Regulator von FtsZ und reguliert während der Zellteilung die Frequenz und Positionierung der FtsZ-Polymerisierung zum Z-Ring (Levin *et al.*, 1999, Levin *et al.*, 2001, Haeusser *et al.*, 2004). Die zusätzliche Deletion von *gpsB* in der Δ *ezrA*-Deletionsmutante führte zu einem starken Wachstumsdefekt, starker Lyse und einem Zellteilungsdefekt. 10% der Zellen wiesen

geschwollene Zellpole oder Ausstülpungen an den Septen auf (Claessen *et al.*, 2008). In Abwesenheit von GpsB und EzrA ist die Lokalisation der Zellwandsynthese am Septum gestört. Die Hydrolyse der Zellwand am Teilungsseptum und die Separation der Tochterzellen beginnt in der $\Delta gpbB \Delta ezaA$ -Doppelmutante bevor das vollständige Septum gebildet wurde, wodurch die Zellen lysieren (Claessen *et al.*, 2008). Bacterial Two-Hybrid Assays zeigten eine direkte Interaktion zwischen GpsB und EzrA. Des Weiteren konnten Interaktionen zwischen GpsB und PBP1, einem bi-funktionalen Penicillin-bindenden Protein, und zwischen GpsB und MreC nachgewiesen werden (Claessen *et al.*, 2008). MreC und EzrA interagieren mit PBP1 über dessen Transmembrandomäne. Dahingegen konnte gezeigt werden, dass für die Interaktion von GpsB mit PBP1 die Transmembrandomäne und der C-Terminus vorhanden sein müssen (Claessen *et al.*, 2008). PBP1 scheint sowohl an der Zellteilung über die Interaktion mit EzrA als auch dem Zellwachstum über die Interaktion mit MreC beteiligt zu sein (Claessen *et al.*, 2008). Während der Sporulation kann GpsB am Sporulationsseptum nachgewiesen werden (Tavares *et al.*, 2008). In vegetativ wachsenden Zellen sind GpsB und PBP1 am Septum und an der lateralen Zellwand lokalisiert (Pedersen *et al.*, 1999, Scheffers *et al.*, 2004, Claessen *et al.*, 2008, Tavares *et al.*, 2008). GpsB befindet sich in den Tochterzellen direkt nach der Zellteilung an den neuen Zellpolen, wandert von dort zum Zellzylinder und ist ab einer gewissen Zelllänge an den neuen Septen lokalisiert. PBP1 weist über den Zellzyklus die gleiche dynamische Lokalisation wie GpsB auf (Claessen *et al.*, 2008). Die Deletion von *gpbB* in *B. subtilis* hatte keinen Einfluss auf die Lokalisation von PBP1 (Claessen *et al.*, 2008). Im Gegensatz dazu führte die Abwesenheit von EzrA dazu, dass PBP1 und GpsB hauptsächlich an der lateralen Zellwand zu finden sind und die Rekrutierung zum Septum reduziert ist (Claessen *et al.*, 2008). Demnach ist die Lokalisation beider Proteine in *B. subtilis* von EzrA abhängig. Der EzrA-abhängige Effekt auf die Lokalisation von PBP1 wird durch die gleichzeitige Deletion von *gpbB* und *ezaA* verstärkt (Claessen *et al.*, 2008). *B. subtilis* Zellen, in denen beide Gene deletiert sind, wiesen PBP1 zur gleichen Zeit sowohl am Septum, an der lateralen Zellwand als auch an alten Zellpolen auf (Claessen *et al.*, 2008). EzrA und GpsB kontrollieren demnach die subzelluläre Lokalisation von PBP1 während der Zellwandsynthese. PBP1 wird durch EzrA zum Septum rekrutiert und GpsB ermöglicht nach Beendigung der Zellteilung die Lokalisation von PBP1 an der lateralen Zellwand, um den Wechsel von der septalen Zellwandsynthese zur lateralen Zellwandsynthese zu gewährleisten (Claessen *et al.*, 2008).

Interessanterweise konnten Tavares *et al.* keine synthetic sickness bei der gleichzeitigen Deletion von *gpbB* und *ezaA* in *B. subtilis* beobachten (Tavares *et al.*, 2008). Im Gegensatz

dazu führte die Depletion von FtsA in der Δ *gpsB*-Mutante zu einem deutlich verstärkten Phänotyp im Vergleich zu den Einzelmутanten, der sich in einer drastischen Zellverlängerung und einer gesteigerten Lyse der Zellen äußerte (Tavares *et al.*, 2008). Dies könnte ein Indiz für die Beteiligung von GpsB an der Bildung des Septums durch die Regulation der septalen Zellwandsynthese sein (Tavares *et al.*, 2008). Diese Hypothese wird auch durch die nachgewiesene Interaktion zwischen GpsB und MreC bekräftigt, da MreC und MreD die laterale Zellwandsynthese durch die Interaktion mit MreB beeinflussen (Levin *et al.*, 1992, Lee und Stewart, 2003, Leaver und Errington, 2005, Claessen *et al.*, 2008). Zudem konnte eine Kolokalisation von GpsB und FtsZ in 50% der Zellen gezeigt werden, in denen der Z-Ring bereits gebildet wurde (Tavares *et al.*, 2008). Die Häufigkeit der beobachteten Kolokalisation von DivIVA und FtsZ ist dazu vergleichbar (Harry und Lewis, 2003). Daher ist anzunehmen, dass GpsB wie DivIVA in *B. subtilis* (Eswaramoorthy *et al.*, 2011) zu einem späteren Zeitpunkt der Zellteilung in der Zellmitte lokalisiert und GpsB somit auch zu den späten Zellteilungsproteinen zählt.

1.8.2.2. GpsB in *S. pneumoniae*

Im Gegensatz zum stäbchenförmigen Bakterium *B. subtilis*, weist *S. pneumoniae* eine ellipsoide Zellform auf. Zur Erhaltung dieser Zellform erfolgt in *S. pneumoniae* eine Kombination aus peripherer (lateraler) und septaler Peptidoglykansynthese (Higgins und Shockman, 1976, Zapun *et al.*, 2008b, Massidda *et al.*, 2013, Pinho *et al.*, 2013). Diese beiden Prozesse müssen somit kontrolliert und reguliert werden. Pbp2x, ein mono-funktionales Penicillin-bindendes Protein von *S. pneumoniae*, ist essenziell für die Synthese des Septums, wohingegen das mono-funktionale PBP Pbp2b für die periphere Peptidoglykansynthese verantwortlich ist (Perez-Nunez *et al.*, 2011, Berg *et al.*, 2013). Pbp2x und das bi-funktionale PBP Pbp1a, welches das PBP1-Homolog von *B. subtilis* ist, lokalisieren während der Zellteilung am Teilungsseptum und bilden eine ringähnliche Struktur. Nach Beendigung der Zellteilung sind die beiden PBPs am Zelläquator der beiden Tochterzellen zu finden (Morlot *et al.*, 2003, Land *et al.*, 2013). FtsZ und GpsB sind im Gegensatz dazu nur bis zur späten Phase der Zellteilung am Septum lokalisiert und wandern dann zum Zelläquator der späteren Tochterzellen. Dabei weist GpsB eine diffusere Lokalisation als FtsZ auf (Land *et al.*, 2013). In den pathogenen *S. pneumoniae*-Stämmen des Serotyps 2, D39, und des Serotyps 4, TIGR4, die von einer Kapsel umgeben sind, ist das *gpsB*-Gen essenziell (van Opijnen *et al.*, 2009, Land *et al.*, 2013, Fleurie *et al.*, 2014). Dahingegen konnte *gpsB* in den Stämmen R6 und RX1, die keine Kapsel besitzen, und dem Laborstamm R800 deletiert werden (Fleurie *et al.*,

2014). Um den Einfluss von GpsB auf die Zellmorphologie, das Wachstum und die Peptidoglykansynthese im Stamm D39 zu untersuchen, wurde eine konditionale *gpsB*-Mutante (IU4888) hergestellt (Land *et al.*, 2013). Da die Kapsel, die die D39-Zellen umgibt, mögliche morphologische Defekte, die aus der Depletion von GpsB resultieren können, maskieren würden, wurde das D39-Derivat IU1945 verwendet, welches keine Kapsel besitzt. Die Deletion von *gpsB* in den *S.pneumoniae*-Stämmen R6, R800 und RX1 und die Depletion von GpsB im Stamm IU4888 führen zu einem deutlichen Wachstumsdefekt und einer Verlängerung der Zellen (Land *et al.*, 2013, Fleurie *et al.*, 2014). Die Abwesenheit von GpsB resultierte im Stamm R800 in einer Lebensfähigkeit von 60% und zu einer Ausbildung von Zellen mit irregulärer Form. Bei diesen Zellen ist die Initiation der Zellteilung sichtbar, die Einschnürung der Zelle wird jedoch verhindert (Fleurie *et al.*, 2014). FtsZ weist in dieser Δ *gpsB*-Mutante während des Zellwachstums eine helikale Lokalisation auf. Diese helikalen FtsZ-Strukturen teilen sich und bilden mehrere neue Z-Ringe. Die Penicillin-bindenden Proteine Pbp2x und Pbp2b, die Flippasen RodA und FtsW und die Zellteilungsproteine DivIVA und EzrA bilden ebenfalls helikale Strukturen aus (Fleurie *et al.*, 2014). Die Depletion von GpsB im D39-Derivat IU4888 führt hingegen nicht zur Ausbildung helikaler FtsZ-Strukturen, sondern äußert sich in der Bildung mehrerer FtsZ-Ringe, die sich nicht einschnüren können. Mit Hilfe von Van-FL konnte gezeigt werden, dass die Peptidoglykansynthese im Stamm IU4888 in Abwesenheit von GpsB an den gleichen Positionen stattfindet, an denen FtsZ zu finden ist und somit ebenfalls eine helikale Anordnung aufweist. Diese ringähnlichen Van-FL-Signale konnten auch im Stamm IU1945 detektiert werden, wenn das zellteilungsspezifische PBP Pbp2x durch das Antibiotikum Methicillin inhibiert wurde. Darüber hinaus führt die Hemmung von Pbp2x ebenfalls zur Bildung verlängerter Zellen und somit zu einem *gpsB*-ähnlichen Phänotyp (Land *et al.*, 2013). Die Depletion von GpsB im *S. pneumoniae*-Stamm IU4888 verhindert somit den Ringschluss und führt zu einem Defekt in der septalen Peptidoglykansynthese. GpsB kontrolliert möglicherweise in diesem *S. pneumoniae*-Stamm den Ringschluss des FtsZ-Rings, in dem es die Verbindung zwischen dem Z-Ring und anderen Komponenten, die am Ringschluss beteiligt sind wie z.B. Pbp2x, StkP/PhpP, SepF, FtsL und DivIC (Fadda *et al.*, 2003, Noirclerc-Savoye *et al.*, 2005, Hamoen *et al.*, 2006, Kawai und Ogasawara, 2006, Beilharz *et al.*, 2012, Fleurie *et al.*, 2012, Strauss *et al.*, 2012, Morlot *et al.*, 2013), herstellt (Land *et al.*, 2013). Im *S. pneumoniae*-Stamm R800 führt die gleichzeitige Deletion von *gpsB* und *divIVA* zur septalen Lokalisation von FtsZ. Die Δ *gpsB* Δ *divIVA*-Doppelmutante bildet wie die Δ *divIVA*-Mutante Zellketten, weist jedoch die gleiche Lebensfähigkeit wie die Δ *gpsB*-

Mutante auf (Fleurie *et al.*, 2014). GpsB beeinflusst somit die septale Zellwandsynthese, wohingegen DivIVA einen Einfluss auf die periphere Zellwandsynthese und die Separation der Tochterzellen hat.

Der Phänotyp der *S. pneumoniae* Δ *gpsB*-Mutante ähnelt dem Phänotyp eines *S. pneumoniae*-Stammes, der lediglich eine inaktive Form der Serin/Threonin-Kinase StkP besitzt (Beilharz *et al.*, 2012, Fleurie *et al.*, 2012). In Abwesenheit von GpsB im *S. pneumoniae*-Stamm R800 ist StkP delokalisiert. Darüber hinaus konnte keine Autophosphorylierung von StkP und keine Phosphorylierung der StkP-Substrate wie z.B. DivIVA nachgewiesen werden. Somit scheint GpsB für die septale Lokalisation von StkP, dessen Autophosphorylierung und der StkP-abhängigen Phosphorylierung von DivIVA notwendig zu sein. Während die Depletion von GpsB und die Expression einer inaktivierten Serin/Threonin-Kinase *stkP* zur Bildung von verlängerten Zellen führt, bildet die Δ *divIVA*-Mutante Zellketten mit Zellen, die eine runde Zellform aufweisen (Fleurie *et al.*, 2014). Wenn DivIVA aufgrund der Abwesenheit von GpsB oder der Inaktivität von StkP nicht phosphoryliert wird, wird die periphere Zellwandsynthese in *S. pneumoniae* angetrieben. Daher führt die Deletion von *gpsB* im Stamm R800, die die septale Lokalisation von StkP und damit die Phosphorylierung von DivIVA verhindert, zur Bildung von verlängerten Zellen (Fleurie *et al.*, 2014). Im Gegensatz dazu wird die periphere Zellwandsynthese durch die Phosphorylierung von DivIVA durch StkP blockiert (Fleurie *et al.*, 2014). GpsB und DivIVA scheinen daher an der Koordination des Zellwachstums und der Zellteilung in *S. pneumoniae* beteiligt zu sein.

1.9. Ziele der Arbeit

Die Funktion von GpsB im humanpathogenen Bakterium *L. monocytogenes* ist bislang noch nicht bekannt. In vorläufigen Experimenten von Dr. Sven Halbedel wurde versucht, das *gpsB*-Gen in *L. monocytogenes* zu deletieren. Da mehrere Deletionsversuche scheiterten, wurde vermutet, dass *gpsB* in *L. monocytogenes* möglicherweise zum Überleben des Organismus notwendig ist und es sich daher um ein essenzielles Gen handeln könnte (Dr. Sven Halbedel, persönliche Mitteilung). In Bacterial Two-Hybrid-Experimenten konnte eine Interaktion von GpsB mit 4 der 5 in *L. monocytogenes* vorhandenen HMW PBPs (PBP A1, PBP B1-3) nachgewiesen werden (Dr. Stephanie Großhennig, persönliche Mitteilung).

Im Verlauf dieser Arbeit sollte GpsB aus *L. monocytogenes* mit Hilfe von biochemischen Methoden, wie z.B. Blue Native PAGE, charakterisiert und seine Funktion mit molekularbiologischen Experimenten aufgeklärt werden. Um den Einfluss von GpsB und der HMW PBPs auf das Wachstum, die Zellteilung und die Virulenz zu untersuchen, wurden verschiedene Deletions- und Depletionsstämme konstruiert und mit Hilfe verschiedener Methoden charakterisiert. Dazu wurden Wachstumskurven erstellt, die Zelllänge einzelner Mutanten miteinander verglichen und die Invasion und intrazelluläre Replikation in Infektionsexperimenten bestimmt.

2. Material und Methoden

2.1. Bakterienstämme und Plasmide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterienstämme und Plasmide sind in Tab. 2 und Tab. 3 erläutert. *E. coli* TOP10 diente als Standardwirt für die verwendeten Plasmide (Sambrook *et al.*, 1989).

Tab. 2: In dieser Arbeit verwendete *L. monocytogenes* Stämme

Name	Genotyp	Referenz/Konstruktion ¹
EGD-e	Wildtypstamm, Serovar 1/2a	(Glaser <i>et al.</i> , 2001)
LMJR3	<i>attB::P_{help}-lacO-gpsBR25A neo</i>	pJR3 → EGD-e
LMJR4	<i>ΔgpsB attB::P_{help}-lacO-gpsBR25A neo</i>	pSH246 ↔ LMJR3
LMJR5	<i>attB::P_{help}-lacO-pbpB2 neo</i>	pJR10 → EGD-e
LMJR18	<i>ΔpbpB2 (lmo2039) attB::P_{help}-lacO-pbpB2 neo</i>	pJR8 ↔ LMJR5
LMJR19	<i>ΔgpsB (lmo1888)</i>	pSH246 ↔ EGD-e
LMJR20	<i>attB::P_{help}-lacO-pbpB1 neo</i>	pJR17 → EGD-e
LMJR21	<i>ΔpbpA1 attB::P_{help}-lacO-pbpA1 neo</i>	pJR18 → LMS57
LMJR27	<i>ΔpbpB1 (lmo1438) attB::P_{help}-lacO-pbpB1 neo</i>	pJR5 ↔ LMJR20
LMJR28	<i>ΔgpsB ΔdivIVA</i>	pSH186 ↔ LMJR19
LMJR29	<i>ΔgpsB attB::P_{help}-gfp-pbpA1 neo</i>	pSH248 → LMJR19
LMJR30	<i>ΔpbpA1 ΔpbpA2 attB::P_{help}-lacO-pbpA1 neo</i>	pJR20 ↔ LMJR21
LMJR31	<i>ΔgpsB attB::P_{help}-lacO-pbpB3 neo</i>	pJR25 → LMJR19
LMJR32	<i>ΔgpsB attB::P_{help}-lacO-pbpB1 neo</i>	pJR20 → LMJR19
LMJR33	<i>ΔgpsB attB::P_{help}-lacO-pbpA1 neo</i>	pJR18 → LMJR19
LMJR34	<i>ΔgpsB attB::P_{help}-lacO-pbpB2 neo</i>	pJR10 → LMJR19
LMJR35	<i>ΔgpsB attB::P_{help}-lacO-pbpA2 neo</i>	pJR19 → LMJR19
LMJR37	<i>ΔgpsB ΔsecA2</i>	pSH314 ↔ LMJR19
LMJR38	<i>ΔpbpA1 ΔgpsB</i>	pSH246 ↔ LMS57
LMJR39	<i>attB::P_{help}-lacO-pbpA1 neo</i>	pJR18 → EGD-e
LMJR41	<i>ΔpbpB3 (lmo0441)</i>	pJR24 ↔ EGD-e
LMJR42	<i>ΔgpsB ΔpbpA1 ΔdivIVA</i>	pSH186 ↔ LMJR38
LMJR49	<i>ΔpbpA1 attB::P_{help}-lacO-pbpA1-flag neo</i>	pJR33 → LMS57
LMJR52	<i>ΔpbpA1 attB::P_{help}-lacO-pbpA1F120A-flag neo</i>	pJR35 → LMS57
LMJR53	<i>ΔpbpA1 attB::P_{help}-lacO-pbpA1S149A T150-flag neo</i>	pJR36 → LMS57
LMJR54	<i>ΔpbpA1 attB::P_{help}-lacO-pbpA1S390A-flag neo</i>	pJR37 → LMS57
LMJR55	<i>ΔpbpA1 attB::P_{help}-lacO-pbpA1S446A-flag neo</i>	pJR38 → LMS57
LMJR56	<i>ΔpbpA1 attB::P_{help}-lacO-pbpA1T571A-flag neo</i>	pJR39 → LMS57
LMJR58	<i>ΔpbpA1 ΔgpsB attB::P_{help}-lacO-pbpA1F120A-flag neo</i>	pJR35 → LMJR38
LMJR59	<i>ΔpbpA1 ΔgpsB attB::P_{help}-lacO-pbpA1S446A-flag neo</i>	pJR38 → LMJR38
LMJR60	<i>ΔpbpA1 ΔgpsB attB::P_{help}-lacO-pbpA1-flag neo</i>	pJR33 → LMJR38
LMJR61	<i>ΔpbpA1 ΔgpsB attB::P_{help}-lacO-pbpA1S149A T150-flag neo</i>	pJR36 → LMJR38
LMJR62	<i>ΔpbpA1 ΔgpsB attB::P_{help}-lacO-pbpA1S390A-flag neo</i>	pJR37 → LMJR38
LMJR63	<i>ΔpbpA1 ΔgpsB attB::P_{help}-lacO-pbpA1T571A-flag neo</i>	pJR39 → LMJR38
LMJR68	<i>ΔgpsB attB::P_{help}-lacO- gpsBL24A neo</i>	pJR2 → LMJR19
LMJR89	<i>ΔgpsB attB::P_{help}-lacO-clpCR254S neo</i>	pJR58 → LMJR19
LMJR90	<i>ΔgpsB attB::P_{help}-lacO-lmo1549L44S neo</i>	pJR59 → LMJR19
LMJR91	<i>ΔgpsB attB::P_{help}-lacO-lmo1921H87Y neo</i>	pJR60 → LMJR19
LMJR92	<i>ΔgpsB attB::P_{help}-lacO-lmo1921¹⁻⁷⁴ neo</i>	pJR61 → LMJR19
LMJR93	<i>ΔgpsB attB::P_{help}-lacO-murZK23E neo</i>	pJR62 → LMJR19
LMJR94	<i>ΔgpsB attB::P_{help}-lacO-murZ¹⁻⁹⁹ neo</i>	pJR63 → LMJR19
LMJR95	<i>ΔgpsB attB::P_{help}-lacO-murZ¹⁻²⁵³ neo</i>	pJR64 → LMJR19
LMJR96	<i>ΔgpsB attB::P_{help}-lacO-lmo1503 neo</i>	pJR65 → LMJR19
LMJR97	<i>ΔgpsB attB::P_{help}-lacO-lmo2550E38G neo</i>	pJR66 → LMJR19
LMJR102	<i>attB::P_{help}-lacO-lmo1503 neo</i>	pJR65 → EGD-e
LMJR103	<i>ΔgpsB ΔmurZ</i>	pJR68 ↔ LMJR19
LMJR104	<i>ΔmurZ (lmo2552)</i>	pJR68 ↔ EGD-e
LMJR105	<i>ΔgpsB attB::P_{help}-lacO-lmo1549 neo</i>	pJR69 → LMJR19
LMJR106	<i>ΔgpsB attB::P_{help}-lacO-lmo1921 neo</i>	pJR70 → LMJR19

Name	Genotyp	Referenz/Konstruktion ¹
LMJR107	$\Delta gpsB$ attB::P _{help} -lacO-murZ neo	pJR71 → LMJR19
LMJR108	$\Delta lmo2229$ $\Delta gpsB$ attB::P _{help} -lacO-gpsB neo	pJR20 ↔ LMS56
LMJR116	attB::P _{help} -lacO-murA neo	pJR82 → EGD-e
LMJR117	$\Delta gpsB$ attB::P _{help} -lacO-murA neo	pJR82 → LMJR19
LMJR118	$\Delta lmo1549$	pJR84 ↔ EGD-e
LMJR119	$\Delta gpsB$ $\Delta lmo1549$	pJR84 ↔ LMJR19
LMJR120	$\Delta gpsB$ $\Delta lmo1921$	pJR83 ↔ LMJR19
LMJR121	$\Delta lmo1921$	pJR83 ↔ EGD-e
LMJR122	$\Delta gpsB$ $\Delta murA$ attB::P _{help} -lacO-murA neo	pJR67 ↔ LMJR117
LMJR123	$\Delta murA$ (lmo2526) attB::P _{help} -lacO-murA neo	pJR67 ↔ LMJR116
LMJR130	$\Delta gpsB$ attB::P _{help} -lacO-gpsBY27A neo	pJR95 → LMJR19
LMJR131	$\Delta gpsB$ attB::P _{help} -lacO-gpsBV32A neo	pJR96 → LMJR19
LMJR132	$\Delta gpsB$ attB::P _{help} -lacO-gpsBL36A neo	pJR97 → LMJR19
LMJR133	$\Delta gpsB$ attB::P _{help} -lacO-gpsBD37A neo	pJR98 → LMJR19
LMJR134	$\Delta gpsB$ attB::P _{help} -lacO-gpsBI40A neo	pJR99 → LMJR19
LMJR135	$\Delta gpsB$ attB::P _{help} -lacO-gpsBD33A neo	pJR120 → LMJR19
LMJR136	$\Delta lmo1503$	pJR126 ↔ EGD-e
LMJR137	$\Delta gpsB$ $\Delta lmo1503$	pJR126 ↔ LMJR19
LMJR138	$\Delta clpC$ (lmo0232)	pJR127 ↔ EGD-e
LMJR139	$\Delta gpsB$ $\Delta clpC$	pJR127 ↔ LMJR19
LMJR156	$\Delta lmo2550$	pJR130 ↔ EGD-e
LMJR157	$\Delta gpsB$ $\Delta lmo2550$	pJR130 ↔ LMJR19
LMJR163	$\Delta gpsB$ attB::P _{help} -lacO-gpsBR96A neo	pJR135 → LMJR19
LMJR164	$\Delta gpsB$ attB::P _{help} -lacO-gpsBE101A neo	pJR136 → LMJR19
LMS2	$\Delta divIVA$ (lmo2020)	(Halbedel <i>et al.</i> , 2012)
LMS10	attB::P _{help} -gfp neo	(Halbedel <i>et al.</i> , 2012)
LMS38	attB::P _{help} -gfp-pbpA2 neo	(Rismondo <i>et al.</i> , 2015b)
LMS44	attB::P _{help} -gfp-pbpA1 neo	(Rismondo <i>et al.</i> , 2015b)
LMS45	attB::P _{help} -gfp-pbpB2 neo	(Rismondo <i>et al.</i> , 2015b)
LMS46	attB::P _{help} -gfp-pbpB1 neo	(Rismondo <i>et al.</i> , 2015b)
LMS47	attB::P _{help} -gfp-pbpB3 neo	(Rismondo <i>et al.</i> , 2015b)
LMS56	$\Delta gpsB$ attB::P _{help} -lacO-gpsB neo	Dr. Sven Halbedel
LMS57	$\Delta pbpA1$ (lmo1892)	(Rismondo <i>et al.</i> , 2015b)
LMS64	$\Delta pbpA2$ (lmo2229)	(Rismondo <i>et al.</i> , 2015b)
LMS81	$\Delta secA2$ (lmo0583)	(Halbedel <i>et al.</i> , 2012)
shg4	$\Delta gpsB$ clpCR254S	diese Arbeit
shg5	$\Delta gpsB$ clpCR254S lmo1549L44S	diese Arbeit
shg6	$\Delta gpsB$ murZK23E lmo2550E38G	diese Arbeit
shg7	$\Delta gpsB$ murZ ¹⁻⁹⁹	diese Arbeit
shg8	$\Delta gpsB$ lmo1921H87Y	diese Arbeit
shg9	$\Delta gpsB$ murZ ¹⁻²⁵³	diese Arbeit
shg10	$\Delta gpsB$ lmo1921 ¹⁻⁷⁴	diese Arbeit
shg11	$\Delta gpsB$ lmo1921 ¹⁻⁷⁴	diese Arbeit
shg12	$\Delta gpsB$ lmo1503 ^{RBS}	diese Arbeit
shg13	$\Delta gpsB$ lmo1921 ¹⁻⁷⁴	diese Arbeit

¹ Der Pfeil (→) steht für die Transformation eines Plasmides und der Doppelpfeil (↔) steht für eine Gendeletion unter Verwendung des pMAD-Deletionssystem (siehe 2.3.5.3)

Tab. 3: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Name	Beschreibung	Referenz/Konstruktion
pET11a	bla P _{T7} lacI	Novagen
pIMK2	P _{help} neo	(Monk <i>et al.</i> , 2008)
pIMK3	P _{help} -lacO lacI neo	(Monk <i>et al.</i> , 2008)
pMAD	bla erm bgaB	(Arnaud <i>et al.</i> , 2004)
pUC19	bla lacZa	Invitrogen
pUT18	bla P _{lac} -cya(T18)	(Karimova <i>et al.</i> , 1998)
pUT18c	bla P _{lac} -cya(T18)	(Karimova <i>et al.</i> , 1998)
pKT25	kan P _{lac} -cya(T25)	(Karimova <i>et al.</i> , 1998)
p25-N	kan P _{lac} -cya(T25)	(Karimova <i>et al.</i> , 1998)
pJR1	bla P _{T7} -gpsB-strep lacI	gpsB (JR1/JR2) über SpeI/XhoI in pET11a

Name	Beschreibung	Referenz/Konstruktion
pJR2	<i>P_{help}-lacO-gpsBL24A lacI neo</i>	L24A mit SHW277/SHW278 in pSH254
pJR3	<i>P_{help}-lacO-gpsBR25A lacI neo</i>	R25A mit SHW281/SHW282 in pSH254
pJR4	<i>bla ΔpbpB1</i>	Fusion von <i>pbpB1</i> upstream (JR10/JR11) und <i>pbpB1</i> downstream (JR12/JR13), in <i>SmaI</i> geschnittenen pUC19
pJR5	<i>bla erm bgaB ΔpbpB1</i>	<i>ΔpbpB1</i> aus pJR4 über <i>NcoI</i> in pMAD
pJR7	<i>bla ΔpbpB2</i>	Fusion von <i>pbpB2</i> upstream (JR20/JR33) und <i>pbpB2</i> downstream (JR34/JR35), in <i>SmaI</i> geschnittenen pUC19
pJR8	<i>bla erm bgaB ΔpbpB2</i>	<i>ΔpbpB2</i> aus pJR7 über <i>BamHI/BglII</i> in pSH186
pJR10	<i>P_{help}-lacO-pbpB2 lacI neo</i>	<i>gfp</i> aus pSH286 mit JR48/49 entfernt
pJR17	<i>P_{help}-lacO-pbpB1 lacI neo</i>	<i>pbpB1</i> (JR57/JR58) über <i>XmaI/ClaI</i> in pIMK3
pJR18	<i>P_{help}-lacO-pbpA1 lacI neo</i>	<i>pbpA1</i> (JR53/JR54) über <i>NcoI/BamHI</i> in pIMK3
pJR19	<i>P_{help}-lacO-pbpA2 lacI neo</i>	<i>pbpA2</i> (JR55/JR56) über <i>BamHI/SalI</i> in pIMK3
pJR20	<i>bla erm bgaB ΔpbpA2-gfp</i>	Subklonierung von <i>ΔpbpA2-gfp</i> aus pSH263 in pMAD
pJR21	<i>bla P_{T7}-gpsB^{ΔC(1-89)}-strep lacI</i>	<i>gpsB^{ΔC(1-89)}</i> mit SHW480/SHW481 in pJR1
pJR24	<i>bla erm bgaB ΔpbpB3-gfp</i>	Subklonierung von <i>ΔpbpB3-gfp</i> aus pSH282 in pMAD
pJR25	<i>P_{help}-lacO-pbpB3 lacI neo</i>	<i>pbpB3</i> (JR77/JR78) über <i>NcoI/SalI</i> in pIMK3
pJR33	<i>P_{help}-lacO-pbpA1-flag lacI neo</i>	Insertion von <i>flag</i> (JR109/JR110) in pJR18
pJR35	<i>P_{help}-lacO-pbpA1F120A-flag lacI neo</i>	F120A mit JR113/JR114 in pJR33
pJR36	<i>P_{help}-lacO-pbpA1S149A T150A-flag lacI neo</i>	S149A T150A mit JR117/JR118 in pJR33
pJR37	<i>P_{help}-lacO-pbpA1S390A-flag lacI neo</i>	S390A mit JR119/JR120 in pJR33
pJR38	<i>P_{help}-lacO-pbpA1S446A-flag lacI neo</i>	S446A mit JR121/JR122 in pJR33
pJR39	<i>P_{help}-lacO-pbpA1T571A-flag lacI neo</i>	T571A mit JR123/JR124 in pJR33
pJR58	<i>P_{help}-lacO-clpCR254S lacI neo</i>	<i>clpCR254S</i> aus <i>shg5</i> (JR159/JR160) über <i>PstI/SalI</i> in pIMK3
pJR59	<i>P_{help}-lacO-lmo1549L44S lacI neo</i>	<i>lmo1549L44S</i> aus <i>shg5</i> (JR161/JR162) über <i>NcoI/SalI</i> in pIMK3
pJR60	<i>P_{help}-lacO-lmo192IH87Y lacI neo</i>	<i>lmo192IH87Y</i> aus <i>shg8</i> (JR163/JR164) über <i>NcoI/SalI</i> in pIMK3
pJR61	<i>P_{help}-lacO-lmo192I¹⁻⁷⁴ lacI neo</i>	<i>lmo192I¹⁻⁷⁴</i> aus <i>shg10</i> (JR163/JR164) über <i>NcoI/SalI</i> in pIMK3
pJR62	<i>P_{help}-lacO-murZK23E lacI neo</i>	<i>murZK23E</i> aus <i>shg6</i> (JR167/JR168) über <i>NcoI/SalI</i> in pIMK3
pJR63	<i>P_{help}-lacO-murZ¹⁻⁹⁹ lacI neo</i>	<i>murZ¹⁻⁹⁹</i> aus <i>shg7</i> (JR167/JR168) über <i>NcoI/SalI</i> in pIMK3
pJR64	<i>P_{help}-lacO-murZ¹⁻²⁵³ lacI neo</i>	<i>murZ¹⁻²⁵³</i> aus <i>shg9</i> (JR167/JR168) über <i>NcoI/SalI</i> in pIMK3
pJR65	<i>P_{help}-lacO-lmo1503 lacI neo</i>	<i>lmo1503</i> aus <i>shg12</i> (JR169/JR170) über <i>NcoI/SalI</i> in pIMK3
pJR66	<i>P_{help}-lacO-lmo2550E38G lacI neo</i>	<i>lmo2550E38G</i> aus <i>shg6</i> (JR165/JR166) über <i>NcoI/SalI</i> in pIMK3
pJR67	<i>bla erm bgaB ΔmurA</i>	Fusion von <i>murA</i> upstream (JR173/JR179) und <i>murA</i> downstream (JR174/JR180) über <i>BamHI/NcoI</i> in pMAD
pJR68	<i>bla erm bgaB ΔmurZ</i>	Fusion von <i>murZ</i> upstream (JR175/JR183) und <i>murZ</i> downstream (JR176/JR184) über <i>BamHI/EcoRI</i> in pMAD
pJR69	<i>P_{help}-lacO-lmo1549 lacI neo</i>	<i>lmo1549</i> (JR161/JR162) über <i>NcoI/SalI</i> in pIMK3
pJR70	<i>P_{help}-lacO-lmo1921 lacI neo</i>	<i>lmo1921</i> (JR163/JR164) über <i>NcoI/SalI</i> in pIMK3
pJR71	<i>P_{help}-lacO-murZ lacI neo</i>	<i>murZ</i> (JR167/JR168) über <i>NcoI/SalI</i> in pIMK3
pJR82	<i>P_{help}-lacO-murA lacI neo</i>	<i>murA</i> (JR189/JR190) über <i>NcoI/SalI</i> in pIMK3
pJR83	<i>bla erm bgaB Δlmo1921</i>	Fusion von <i>lmo1921</i> upstream (JR197/JR198) und <i>lmo1921</i> downstream (JR199/JR200) über <i>BamHI/EcoRI</i> in pMAD
pJR84	<i>bla erm bgaB Δlmo1549</i>	Fusion von <i>lmo1549</i> upstream (JR201/JR202) und <i>lmo1549</i> downstream (JR203/JR204) über

Name	Beschreibung	Referenz/Konstruktion
pJR95	<i>P_{help}-lacO-gpsBY27A lacI neo</i>	BamHI/EcoRI in pMAD
pJR96	<i>P_{help}-lacO-gpsBV32A lacI neo</i>	Y27A mit SHW607/SHW608 in pSH254
pJR97	<i>P_{help}-lacO-gpsBL36A lacI neo</i>	V32A mit SHW279/SHW280 in pSH254
pJR98	<i>P_{help}-lacO-gpsBD37A lacI neo</i>	L36A mit SHW619/SHW620 in pSH254
pJR99	<i>P_{help}-lacO-gpsBI40A lacI neo</i>	D37A mit SHW621/SHW622 in pSH254
pJR101	<i>kan P_{lac}-cya(T25)-lmo1503</i>	I40A mit SHW623/SHW624 in pSH254
pJR102	<i>kan P_{lac}-lmo1503-cya(T25)</i>	<i>lmo1503</i> (JR255/JR256) über XbaI/KpnI in pKT25
pJR103	<i>bla P_{lac}-lmo1503-cya(T18)</i>	<i>lmo1503</i> (JR255/JR256) über XbaI/KpnI in p25-N
pJR104	<i>bla P_{lac}-cya(T18)-lmo1503</i>	<i>lmo1503</i> (JR255/JR256) über XbaI/KpnI in pUT18
pJR105	<i>kan P_{lac}-cya(T25)-lmo1549</i>	<i>lmo1503</i> (JR255/JR256) über XbaI/KpnI in pUT18c
pJR106	<i>kan P_{lac}-lmo1549-cya(T25)</i>	<i>lmo1549</i> (JR251/JR252) über XbaI/KpnI in pKT25
pJR107	<i>bla P_{lac}-lmo1549-cya(T18)</i>	<i>lmo1549</i> (JR251/JR252) über XbaI/KpnI in p25-N
pJR108	<i>bla P_{lac}-cya(T18)-lmo1549</i>	<i>lmo1549</i> (JR251/JR252) über XbaI/KpnI in pUT18
pJR109	<i>kan P_{lac}-cya(T25)-lmo1921</i>	<i>lmo1549</i> (JR251/JR252) über XbaI/KpnI in pUT18c
pJR110	<i>kan P_{lac}-lmo1921-cya(T25)</i>	<i>lmo1921</i> (JR253/JR254) über XbaI/KpnI in pKT25
pJR111	<i>bla P_{lac}-cya(T18)-lmo1921</i>	<i>lmo1921</i> (JR253/JR254) über XbaI/KpnI in p25-N
pJR112	<i>kan P_{lac}-cya(T25)-murZ</i>	<i>lmo1921</i> (JR253/JR254) über XbaI/KpnI in pUT18c
pJR113	<i>kan P_{lac}-murZ-cya(T25)</i>	<i>murZ</i> (JR247/JR248) über XbaI/KpnI in pKT25
pJR114	<i>bla P_{lac}-murZ-cya(T18)</i>	<i>murZ</i> (JR247/JR248) über XbaI/KpnI in p25-N
pJR115	<i>bla P_{lac}-cya(T18)-murZ</i>	<i>murZ</i> (JR247/JR248) über XbaI/KpnI in pUT18
pJR116	<i>kan P_{lac}-cya(T25)-murA</i>	<i>murZ</i> (JR247/JR248) über XbaI/KpnI in pUT18c
pJR117	<i>kan P_{lac}-murA-cya(T25)</i>	<i>murA</i> (JR249/JR250) über PstI/KpnI in pKT25
pJR118	<i>bla P_{lac}-murA-cya(T18)</i>	<i>murA</i> (JR249/JR250) über PstI/KpnI in p25-N
pJR119	<i>bla P_{lac}-cya(T18)-murA</i>	<i>murA</i> (JR257/JR250) über PstI/KpnI in pUT18
pJR120	<i>P_{help}-lacO-gpsB D33A lacI neo</i>	<i>murA</i> (JR257/JR250) über PstI/KpnI in pUT18c
pJR121	<i>bla P_{lac}-lmo1921-cya(T18)</i>	D33A mit SHW615/SHW616 in pSH254
pJR126	<i>bla erm bgaB Δlmo1503</i>	<i>lmo1921</i> (JR253/JR254) über XbaI/KpnI in pUT18
pJR127	<i>bla erm bgaB ΔclpC</i>	Fusion von <i>lmo1503</i> upstream (JR264/JR265) und <i>lmo1503</i> downstream (JR266/JR267) über BglII/SalI in pMAD
pJR130	<i>bla erm bgaB Δlmo2550</i>	Fusion von <i>clpC</i> upstream (JR270/JR271) und <i>clpC</i> downstream (JR272/JR273) über BamHI/EcoRI in pMAD
pJR135	<i>P_{help}-lacO-gpsBR96A lacI neo</i>	Fusion von <i>lmo2550</i> upstream (JR280/JR281) und <i>lmo2550</i> downstream (JR282/JR283) über BamHI/NcoI in pMAD
pJR136	<i>P_{help}-lacO-gpsBE101A lacI neo</i>	R96A mit JR294/JR295 in pSH254
pJR137	<i>bla P_{T7}-gpsBR96A-strep lacI</i>	E101A mit JR296/JR297 in pSH254
pJR138	<i>bla P_{T7}-gpsBE101A-strep lacI</i>	R96A mit JR294/JR295 in pJR1
pSH186	<i>bla erm bgaB ΔdivIVA</i>	E101A mit JR296/JR297 in pJR1
pSH222	<i>bla P_{lac}-divIVA-cya(T18)</i>	(Halbedel <i>et al.</i> , 2012)
pSH223	<i>bla P_{lac}-cya(T18)-divIVA</i>	Dr. Sven Halbedel
pSH224	<i>kan P_{lac}-cya(T25)-divIVA</i>	Dr. Sven Halbedel
pSH225	<i>kan P_{lac}-divIVA-cya(T25)</i>	Dr. Sven Halbedel
pSH226	<i>bla P_{lac}-gpsB-cya(T18)</i>	Dr. Sven Halbedel
pSH227	<i>bla P_{lac}-cya(T18)-gpsB</i>	(Rismondo <i>et al.</i> , 2015a)
pSH228	<i>kan P_{lac}-cya(T25)-gpsB</i>	(Rismondo <i>et al.</i> , 2015a)
pSH229	<i>kan P_{lac}-gpsB-cya(T25)</i>	(Rismondo <i>et al.</i> , 2015a)
pSH234	<i>kan P_{lac}-cya(T25)-pbpA1</i>	(Rismondo <i>et al.</i> , 2015a)
pSH246	<i>bla erm bgaB ΔgpsB</i>	(Rismondo <i>et al.</i> , 2015a)
pSH248	<i>P_{help}-gfp-pbpA1 neo</i>	(Rismondo <i>et al.</i> , 2015b)
pSH254	<i>P_{help}-lacO-gpsB lacI neo</i>	(Rismondo <i>et al.</i> , 2015a)
pSH263	<i>bla erm bgaB ´gfp-ΔpbpA2</i>	Dr. Sven Halbedel
pSH282	<i>bla erm bgaB ´gfp-ΔpbpB3</i>	Dr. Sven Halbedel
pSH286	<i>P_{help}-lacO-gfp-pbpA2 lacI neo</i>	(Rismondo <i>et al.</i> , 2015b)
pSH314	<i>bla erm bgaB ΔsecA2</i>	(Halbedel <i>et al.</i> , 2012)

2.2. Kultivierungsbedingungen

2.2.1. Nährmedien und Zusätze für Bakterien

Die verwendeten Medien, Puffer und Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt und anschließend 20 min bei 121°C und 2 bar autoklaviert. Für wasserunlösliche Substanzen wurden andere Lösungsmittel wie z.B. Dimethylsulfoxid (DMSO) oder Ethanol verwendet. Bei Medien, die thermoinstabile Substanzen enthalten, wurde eine Filtersterilisation mit Steritop-GV-Filtern mit einer Porengröße von 0,22 µm oder mit Minisart Spritzenvorsatzfiltern mit einer Porengröße von 0,2 µm durchgeführt. Die Nährmedien wurden, sofern notwendig, mit Zusätzen wie Antibiotika, X-Gal oder IPTG versetzt. Die eingesetzten Konzentrationen sind Tab. 4 zu entnehmen.

Tab. 4: Medienzusätze und deren Endkonzentration in den Medien

Medienzusatz	Stammlösung	Endkonzentration	
Antibiotika		<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>
Ampicillin	100 mg/ml in H ₂ O _{bidest}	100 µg/ml	-
Erythromycin	5 mg/ml in Ethanol	-	50 µg/ml
	100 mg/ml in Ethanol	300 µg/ml	-
Kanamycin	50 mg/ml in H ₂ O _{bidest}	50 µg/ml	50 µg/ml
Weitere Zusätze			
IPTG	1 M in H ₂ O _{bidest}	1 mM	1 mM
X-Gal	50 mg/ml in DMSO	100 µg/ml	100 µg/ml

2.2.2. Kultivierungsbedingungen und Stammhaltung

2.2.2.1. Kultivierung von *E. coli*

Die verwendeten *E. coli*-Stämme wurden in Luria Bertani (LB)-Medium bei 37°C und 250 rpm im Rotationsschüttler (Innova TM43, New Brunswick Scientific) angezogen. Zur Selektion wurden die entsprechenden Antibiotika dem sterilen Medium zugesetzt. Die Anzucht erfolgte in sterilen 10 ml Glasröhrchen oder in Erlenmeyerkolben verschiedener Größe. Für vorübergehende Lagerung wurden *E. coli*-Stämme auf LB-Agarplatten ausgestrichen, über Nacht bei 37°C inkubiert und bei 4°C gelagert. Zur Stammhaltung wurde die Bakterienkultur 1:1 mit 50 % Glycerin (Endkonzentration 25% v/v) gemischt und bei -80°C gelagert.

LB-Medium:	Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	10 g
	H ₂ O _{bidest}	ad. 1 l
LB-Agar:	Agar	10 g
	LB-Medium	ad. 1 l

2.2.2.2. Kultivierung von *L. monocytogenes*

Die Kultivierung von *L. monocytogenes*-Stämme erfolgte in Brain Heart Infusion (BHI)-Medium, das, sofern notwendig, mit Antibiotika oder anderen Zusätzen versetzt wurde, bei 37°C und 250 rpm. Dazu wurden ebenfalls 10 ml Glasröhrchen oder Erlenmeyerkolben verwendet. Für kurzfristige Aufbewahrung von *L. monocytogenes*-Stämmen wurden BHI-Agarplatten beimpft, bei 37°C inkubiert und anschließend bei 4°C gelagert. Zur dauerhaften Lagerung der konstruierten Stämme wurden 25%-ige Glycerinkulturen hergestellt und bei -80°C aufbewahrt.

BHI-Medium:	BHI Bouillon (Oxoid)	37 g
	H ₂ O _{bidest}	ad. 1 l
BHI-Agar:	Agar	10 g
	BHI-Medium	ad. 1 l

2.3. Molekulargenetische Arbeiten mit DNA

2.3.1. Isolierung von DNA

2.3.1.1. Plasmidisolation mittels Spin-Säulen

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA wurden 3 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* TOP10-Derivaten bei 16.100 x g pelletiert (Eppendorf-Zentrifuge 5415 R). Zur Präparation der Plasmid-DNA aus dem Zellpellet wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN GmbH) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstelleranweisungen, jedoch wurde die Plasmid-DNA mit H₂O_{bidest} eluiert. Die isolierte DNA wurde bis zur Verwendung für präparative Restriktion oder Transformationen bei -20°C gelagert.

2.3.1.2. Isolation von chromosomaler DNA aus *L. monocytogenes*

Zur Isolation von chromosomaler DNA wurden die Bakterienzellen in 3 ml BHI-Medium und dem benötigten Antibiotikum über Nacht bei 37°C und 250 rpm angezogen. Anschließend wurde 1 ml der Zellen durch 1-minütige Zentrifugation bei 16.100 x g geerntet. Das erhaltene Zellpellet wurde in 400 µl TES-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 40 µl Lysozym (Stammlösung: 100 mg/ml) wurde der Ansatz bei 37°C für 40 min inkubiert. Der Ansatz wurde zur Präzipitation der Proteine mit 40 µl 20% SDS und anschließend mit 400 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und gemischt. Nach 4-minütiger Zentrifugation bei 16.100 x g wurde die wässrige Phase unter Verwendung einer abgeschnittenen Spitze in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, das 500 µl Chloroform enthielt. Nach kurzem Mischen wurde die Lösung 4 min bei 16.100 x g zentrifugiert und die wässrige Phase wiederum in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, das 1 ml 96%igen Ethanol enthalten hatte. Der Ansatz wurde anschließend geschüttelt und das DNA-Präzipitat durch Zentrifugation pelletiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen. Nach Trocknung des DNA-Pellets wurde es in 100-200 µl TE-Puffer gelöst.

TES-Puffer:	1 M EDTA pH7,5	1 ml
	20% SDS	5 ml
	1 M Tris-HCl pH7,5	10 ml
	H ₂ O _{bidest}	ad. 1 l
TE-Puffer:	0,5 M EDTA pH8,0	0,2 ml
	1 M Tris-HCl pH8,0	1 ml
	H ₂ O _{bidest}	ad. 100 ml

2.3.2. DNA-Techniken

2.3.2.1. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der DNA wurden 1%-ige Agarosegele (w/v) verwendet, die in horizontale Flachbrett-Elektrophorese-Kammern (Gelkammer (Mini) SubCell GT, Bio-Rad Laboratories GmbH) gegeben wurden. Die Agarose (Promega) wurde in 1 x TAE-Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst und anschließend das Gel mit Hilfe eines Gießstandes gegossen.

Die aufzutrennenden Proben wurden mit dem 0,2-fachen Volumen 6 x DNA Ladepuffer gemischt. Je nach DNA-Größe und -Konzentration wurden 5-10 µl (analytische Gele) bzw.

60-100 µl (präparative Gele) der zu untersuchenden Probe aufgetragen. Als Elektrodenpuffer wurde 1 x TAE-Puffer verwendet. Die Auftrennung der DNA-Proben erfolgte bei 100-120 V (PowerPack 300, Bio-Rad Laboratories GmbH) für 35-50 min. Anschließend wurde das Gel für 10-20 min im Ethidiumbromid-Bad inkubiert, bis eine ausreichende Färbung erreicht wurde. Die Dokumentation der DNA-Banden, die mittels UV-Licht sichtbar gemacht wurden, erfolgte mit dem Molecular Imager® Gel Doc™ 2000 Dokumentationssystem und der Quantity One® 1-D Analysesoftware (Bio-Rad Laboratories GmbH). Zur Bestimmung der Größe linearer DNA-Fragmente in Agarose-Gelen wurde der Gene Ruler™ DNA Ladder Mix (Thermo Scientific, Fermentas) verwendet, von dem jeweils 5 µl im Gel aufgetragen wurden.

6 x DNA-Ladepuffer:	Bromphenolblau	0,25% (w/v)
	Xylencyanol FF	0,25% (w/v)
	Glycerin	30%
50 x TAE-Puffer:	0,5 M EDTA pH8,0	100 ml
	Eisessig	57,1 ml
	Tris-Base	242 g
	H ₂ O _{bidest}	ad. 1 l
Ethidiumbromid-Bad	0,5%-iges Ethidiumbromid	100 µl
	H ₂ O _{bidest}	ad. 1 l

2.3.2.2. DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von DNA-Fragmenten wurde mit dem Implen Nanophotometer bei 260 nm bestimmt.

2.3.2.3. Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Restriktion von DNA erfolgte in einem Gesamtvolumen von 10 µl (analytisch) bis 60 µl (präparativ). Die DNA wurde mit maximal 0,1-fachen Volumen Enzymlösung eine Stunde oder über Nacht bei der für das Enzym spezifischen Temperatur inkubiert. Als Inkubationspuffer dienten die vom Hersteller mitgelieferten Puffer, die 10-fach konzentriert vorlagen und auf einfache Konzentration verdünnt wurden. Der Puffer wurde, wenn notwendig, mit BSA versetzt. Anschließend erfolgte eine Überprüfung der Restriktion mittels Agarose-Gelelektrophorese.

2.3.2.5. Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die zu reinigenden DNA-Fragmente wurden in einem präparativen Agarose-Gel aufgetrennt. Das entsprechende Fragment wurde anschließend im langwelligen UV-Licht aus dem Gel herausgeschnitten und unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH) aus dem Agaroseblock gereinigt. Dabei wurde den Anweisungen des Herstellers Folge geleistet, die DNA wurde allerdings mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ eluiert. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20°C .

2.3.2.6. Reinigung von PCR-Produkten

Die Reinigung von PCR-Produkten erfolgte unter Verwendung des QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN GmbH) entsprechend den Anweisungen des Herstellers. Die Elution der DNA erfolgte jedoch mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$. Die DNA wurde anschließend bei -20°C gelagert.

2.3.2.7. Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde in einem Gesamtvolumen von $20\ \mu\text{l}$ durchgeführt. Dabei betrug das Verhältnis zwischen Vektor- und Fragment-DNA ca. 1:5. Nach Zugabe von je $2\ \mu\text{l}$ $10\times$ Ligationspuffer und T4-DNA-Ligase (New England Biolabs) wurde $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ zugegeben, um das finale Volumen von $20\ \mu\text{l}$ zu erreichen. Um eine gute Ligationseffizienz zu erzielen, wurden die Ligationsansätze in einem lauwarmen Wasserbad bei 4°C über Nacht inkubiert, damit die Temperatur kontinuierlich herabgesetzt wird.

2.3.3. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

2.3.3.1. Auswahl der Primer

Die Ableitung der Oligonukleotidprimer erfolgte unter Verwendung des Computerprogramms Clone Manager Professional 9 (Sci-Ed Software) und dem im Internet verfügbaren Oligonucleotide Properties Calculator (Oligo Calc) (Kibbe, 2007).

Die Primer (Tab. 5) wurden von kommerziellen Anbietern (Eurofins MWG Operon) in lyophilisierter Form bezogen und anschließend in sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gelöst.

Tab. 5: In der Arbeit verwendete Primer

Name	Sequenz 5'→3'	Beschreibung ¹
JR1	GCGCGCACTAGTACTTCGGAACAATTTGAG	<i>gpsB-strep</i> in pET11a (fw), SpeI
JR2	GCGCGCCTCGAGTTATTTTTCGAACTGCGGGTGGCTC CATTCGTTATCGTCCAGCTT	<i>gpsB-strep</i> in pET11a (rev), XhoI
JR10	CGGGATCCATGAGCAGAAAAATTGCAAGCATT	<i>pbpB1</i> upstream (fw), BamHI

Name	Sequenz 5'→3'	Beschreibung ¹
JR11	ATATGTCGACTTTCACGCATAGTTACCTCACTTT	<i>pbpB1</i> upstream (rev), Sall
JR12	ATATGTCGACAATTAATCAAAAACCACTTTCATTTAT	<i>pbpB1</i> downstream (fw), Sall
JR13	GCATGCCATGGAGTCATTCTCTGTGAAAACGTCAA	<i>pbpB1</i> downstream (rev), NcoI
JR20	ATACGAGATCTGTCGTCGCGAAGTGAAACCAATTG	<i>pbpB2</i> upstream (fw), BglII
JR33	TATTAGTCGACTTTCATTGACCATCTACCACTTTC	<i>pbpB2</i> upstream (rev), Sall
JR34	TGAAAGTCGACTAATAATAGGAAGATAGAAGTATGT C	<i>pbpB2</i> downstream (fw), Sall
JR35	CGTGGATCCGATCTTGAGACAAATTCATAAAC	<i>pbpB2</i> downstream (rev), BamHI
JR48	ACGCCGTTTATCCTTTTCCATGGGTTTCAC	Entfernen von <i>gfp</i> in pSH286 (fw)
JR49	AAGGATAAACGGCGTATAGGTAACATGAG	Entfernen von <i>gfp</i> in pSH286 (rev)
JR53	GCGCCCATGGCAGATAAACCGCAGACAAG	<i>pbpA1</i> in pIMK3 (fw), NcoI
JR54	GCGCGGATCCTTAACATCTGGAATTTTAACAGTGG	<i>pbpA1</i> in pIMK3 (rev), BamHI
JR55	GCGCGGATCCCGACAAATTCAAACAGCAACTTATTA AATAC	<i>pbpA2</i> in pIMK3 (fw), BamHI
JR56	GCGCGTCGACTTAATTACCTATCGAATCGATTAAAG	<i>pbpA2</i> in pIMK3 (rev), Sall
JR57	TCCCCCGGGCAAACATAAATTTTAGAAAAAGAAAA AAGATTC	<i>pbpB1</i> in pIMK3 (fw), XmaI
JR58	GCCCATCGATTTAATTTTCGGTTTGTCTGATTGTGC	<i>pbpB1</i> in pIMK3 (rev), ClaI
JR77	CGCGCCATGGATGGCTAGTTATGGTGGGAAAAAG	<i>pbpB3</i> in pIMK3 (fw), NcoI
JR78	CGCGGTCGACTTATTTATACATACTTTCAATTACAGG TTTTAAC	<i>pbpB3</i> in pIMK3 (rev), Sall
JR109	GATGACAAGTAAGGATCCTCTAGAGTCGACG	Insertion von <i>flag</i> in pJR18 (fw)
JR110	TTACTTGTCATCGTCATCCTTGTAATCACTATCTGGAA TTTTAAC	Insertion von <i>flag</i> in pJR18 (rev)
JR113	GCGCGTGCTTATGAACATGATGGC	F120A in <i>pbpA1</i> (fw)
JR114	CATAAGCACGCGCATCTTCCGTTG	F120A in <i>pbpA1</i> (rev)
JR117	GCAGCTGCCCTTTCGCAACAAATCATC	S149A T150A in <i>pbpA1</i> (fw)
JR118	CGAAAGGGCAGCTGCACCTTCTG	S149A T150 in <i>pbpA1</i> (rev)
JR119	GGGGCTACTATGAAACCAATTGCC	S390A in <i>pbpA1</i> (fw)
JR120	CATAGTAGCCCCAACAGAACG	S390A in <i>pbpA1</i> (rev)
JR121	CAAGCGCGTAATATTCCAGCCC	S446A in <i>pbpA1</i> (fw)
JR122	CGCGCTTGATAAAGTGCTTGTC	S446A in <i>pbpA1</i> (rev)
JR123	GCTGGTAAAGCAGGTACAACGAATATTC	T571A in <i>pbpA1</i> (fw)
JR124	CTTTACCAGCAGCAGGGACGCC	T571A in <i>pbpA1</i> (rev)
JR159	GCGCCTGCAGGATGTTTGGACGATTACGCAAAGAG CTC	<i>clpC</i> in pIMK3 (fw), PstI
JR160	GCGCGTCGACTTATTTAGCTTTTACTTTTTTAGAGGTT GTTTTTC	<i>clpC</i> in pIMK3 (rev), Sall
JR161	GCGCCCATGGCTTTGACACATGAAATATCAGAGAAT GAAAAACC	<i>lmo1549</i> in pIMK3 (fw), NcoI
JR162	GCGCGTCGACTTAAAAGTAACCTTTTTCTTTCAAAC AATATAC	<i>lmo1549</i> in pIMK3 (rev), Sall
JR163	GCGCCCATGGCTAAGGCATCCATTTCAATAGACGAG AAG	<i>lmo1921</i> in pIMK3 (fw), NcoI
JR164	GCGCGTCGACTTATTCTTTTTCCGTATCCATTTGCTGT A	<i>lmo1921</i> in pIMK3 (rev), Sall
JR165	GCGCCCATGGCTAAACTAATTACAATATCTGTTCCCTG CATATAATG	<i>lmo2550</i> in pIMK3 (fw), NcoI
JR166	GCGCGTCGACTCATACTATGTCTTCTTTCTCTCCGTTA TATTC	<i>lmo2550</i> in pIMK3 (rev), Sall
JR167	GCGCCCATGGCTACGGATAGATTAATTATTCAAGGTG GC	<i>murZ</i> in pIMK3 (fw), NcoI
JR168	GCGCGTCGACTTAGATATTTGTTTCTGCTGTACTACTA CG	<i>murZ</i> in pIMK3 (rev), Sall
JR169	GCGCCCATGGATTCAAAGATCAAACAATGTTTTACA ACTTC	<i>lmo1503</i> in pIMK3 (fw), NcoI

Name	Sequenz 5'→3'	Beschreibung ¹
JR170	GCGCGTCGACTCATTTCTCACCAATTTTCGTTATTTTTCAG	<i>lmo1503</i> in pIMK3 (rev), SalI
JR173	CGCGGGATCCCCACTAGTTGCTCCACTTAAAATCGAC	<i>murA</i> upstream (fw), BamHI
JR174	GCGCCCATGGCTCCTTGACATGCAGTACCGATTG	<i>murA</i> downstream (rev), NcoI
JR175	CGCGGGATCCGCGATGGTCGTGCTGAACCTTTTACAG	<i>murZ</i> upstream (fw), BamHI
JR176	GCGCGGAATTCGGAAGTACTACATCCGCTTTTACAG	<i>murZ</i> downstream (rev), EcoRI
JR179	TTGAATTTAGAAAGTCGACCAAAAAGAACCCCTCCGC GTTAC	<i>murA</i> upstream (rev), SalI
JR180	GGGTTCTTTTTGGTCGACTTCTAAATTCAAATGTTGA AAACCGTATC	<i>murA</i> downstream (fw), SalI
JR183	TAATTATTAGATGTCGACCACAACGTACCCTTCTTTCT TGAAG	<i>murZ</i> upstream (rev), SalI
JR184	GGTACGTTGTGGTCGACATCTAATAATTAGAGGCTGA GCGAAACAAC	<i>murZ</i> downstream (fw), SalI
JR189	CGCGCCATGGAAAAAATTATTGTACGCGGTGG	<i>murA</i> in pIMK3 (fw), NcoI
JR190	GCGCGTCGACTTAGAATAAAGACGCTAAGTTTGTTAC	<i>murA</i> in pIMK3 (rev), SalI
JR197	GCGCGGATCCCAATTATTTTGAATGGTGCGGTGTC	<i>lmo1921</i> upstream (fw), BamHI
JR198	TCCTTATTCGTCGACCATCTTTCCTCAGTCCCTTCCTG	<i>lmo1921</i> upstream (rev), SalI
JR199	GGAAAGATGGTCGACGAATAAGGAATAAATCCTAGT TAGTAGGG	<i>lmo1921</i> downstream (fw), SalI
JR200	GCGCGGAATTCCCAAGACTCAACCTCTTTCACCTC	<i>lmo1921</i> downstream (rev), EcoRI
JR201	GCGCGGATCCCGTCTCTGCTATTCTGTTTTTAACAAC	<i>lmo1549</i> upstream (fw), BamHI
JR202	CTGGATTTAGTCGACCAACATAAGAACAGCTCCTATT TCATC	<i>lmo1549</i> upstream (rev), SalI
JR203	CTTATGTTGGTCGACTAAATCCAGAATACTGTTTACA AAATATC	<i>lmo1549</i> downstream (fw), SalI
JR204	GCGCGGAATTCGAAGGTACACATATCATTACGCG	<i>lmo1549</i> downstream (rev), EcoRI
JR247	GCGCTCTAGAAACGGATAGATTAATTATTCAAGGTGG C	<i>murZ</i> in B2H (fw), XbaI
JR248	GCGCGGTACCGCGATATTTGTTTCTGCTGTACTACTA C	<i>murZ</i> in B2H (rev), KpnI
JR249	GCGCCTGCAGAAAAAATTATTGTACGCGGTGGAAAA C	<i>murA</i> in pKT25 und p25-N (fw), PstI
JR250	GCGCGGTACCGCGAATAAAGACGCTAAGTTTGTTAC ATCG	<i>murA</i> in B2H (rev), KpnI
JR251	GCGCTCTAGAATTGACACATGAAATATCAGAGAATG AAAAAC	<i>lmo1549</i> in B2H (fw), XbaI
JR252	GCGCGGTACCGCAAAGTAACCTTTTTCTTTCAAAC ATATAC	<i>lmo1549</i> in B2H (rev), KpnI
JR253	GCGCTCTAGAAAAGGCATCCATTTCAATAGACGAG	<i>lmo1921</i> in B2H (fw), XbaI
JR254	GCGCGGTACCTCTTTTCCGTATCCATTTGCTG	<i>lmo1921</i> in B2H (rev), KpnI
JR255	GCGCTCTAGATTCAAAAGATCAAACAATGTTTTACAA C	<i>lmo1503</i> in B2H (fw), XbaI
JR256	GCGCGGTACCTTCTCACCAATTTTCGTTATTTTTCAG	<i>lmo1503</i> in B2H (rev), KpnI
JR257	GCGCCTGCAGGGAATAATTATTGTACGCGGTGGAA AAC	<i>murA</i> in pUT18 und pUT18c (fw), PstI
JR264	GCGCAGATCTGGCAAATACAGCATTGAACATATGTG	<i>lmo1503</i> upstream (fw), BglII
JR265	GCGCGGATCCAATCGAAGCACCTCATTCCTTC	<i>lmo1503</i> upstream (rev), BamHI
JR266	GCGCGGATCCATGAGAATAATGGGTTTAGATGTCGG C	<i>lmo1503</i> downstream (fw), BamHI
JR267	GCGCGTCGACGCTAGGAATGTAGCAAGGATTTCTTC	<i>lmo1503</i> downstream (rev), SalI
JR270	GCGCGGATCCGATGAATAAGAGTGAATATGGTGCGG	<i>clpC</i> upstream (fw), BamHI
JR271	GCGCGTCGACCATCATTGTTGTTTCCTCCTTATCG	<i>clpC</i> upstream (rev), SalI
JR272	GCGCGTCGACTAAGTAGAAAGCCTTCCTTAATAAAA	<i>clpC</i> downstream (fw), SalI

Name	Sequenz 5'→3'	Beschreibung ¹
	AGTTAAGG	
JR273	GCGCGGAATTCCGGTCCCGCAATAGCACCTTCC	<i>clpC</i> downstream (rev), EcoRI
JR280	GCGCGGATCCGGATTTGGACAGCGTGGACTTATTG	<i>lmo2550</i> upstream (fw), BamHI
JR281	GCGCGTCGACCATTATCTTTCTCCTTTTCTTTTTTCCA CTC	<i>lmo2550</i> upstream (rev), SalI
JR282	GCGCGTCGACGTATGAACAAAATAAGAAAATGGTTA GAC	<i>lmo2550</i> downstream (fw), SalI
JR283	GCGCCCATGGCGTTCGTTACATACAGTCTTATTTGAG	<i>lmo2550</i> downstream (rev), NcoI
JR294	CTAAAGGCTCTTTCTAATTTAGAAAAACATG	R96A in <i>gpsB</i> (fw)
JR295	GAAAGAGCCTTTAGAAATATCAAAGTTGG	R96A in <i>gpsB</i> (rev)
JR296	CTAATTTAGCAAAACATGTTTTTGGAAATAAG	E101A in <i>gpsB</i> (fw)
JR297	CATGTTTTGCTAAATTAGAAAGACGCTTTAG	E101A in <i>gpsB</i> (rev)
SHW277	AAACTGGGGCACGTGGTTATAGTCCTG	L24A in <i>gpsB</i> (fw)
SHW278	TAACCACGTGCCCCAGTTTTTAAATTC	L24A in <i>gpsB</i> (rev)
SHW279	CTGAAGATGCAGATGAGTTTTTAGAC	V32A in <i>gpsB</i> (fw)
SHW280	ACTCATCTGCATCTTCAGGACTATAAC	V32A in <i>gpsB</i> (rev)
SHW281	CTGGGCTTGCAAGTTATAGTCCTGAAG	R25A in <i>gpsB</i> (fw)
SHW282	CTATAACCTGCAAGCCCAGTTTTTAAATTC	R25A in <i>gpsB</i> (rev)
SHW480	TGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAATAAC	Entfernung des C-Terminus von <i>gpsB</i> (fw)
SHW481	GGTGGCTCCATCCAGCAGGTTGTGCCGCTGC	Entfernung des C-Terminus von <i>gpsB</i> (rev)
SHW607	TTCGTGGTGCAAGTCCTGAAGATGTTGATGAG	Y27A in <i>gpsB</i> (fw)
SHW608	TCAGGACTTGCAACCGAAGCCAGTTTTTAAATTC	Y27A in <i>gpsB</i> (rev)
SHW615	AAGATGTTGCAGAGTTTTTAGACATGGTTATTAAAG	D33A in <i>gpsB</i> (fw)
SHW616	AAAAACTCTGCAACATCTTCAGGACTATAACC	D33A in <i>gpsB</i> (rev)
SHW619	ATGAGTTTGCAAGACATGGTTATTAAAGATTACAG	L36A in <i>gpsB</i> (fw)
SHW620	ACCATGTCTGCAAACTCATCAACATCTTCAGGAC	L36A in <i>gpsB</i> (rev)
SHW621	AGTTTTTAGCAATGGTTATTAAAGATTACAGTACAT	D37A in <i>gpsB</i> (fw)
SHW622	ATAACCATTGCTAAAACTCATCAACATCTTCAG	D37A in <i>gpsB</i> (rev)
SHW623	ACATGGTTGCAAAAGATTACAGTACATTTACTCAAG	I40A in <i>gpsB</i> (fw)
SHW624	TAATCTTTTGCAACCATGTCTAAAACTCATCAAC	I40A in <i>gpsB</i> (rev)

¹ Die forward- und reverse-Primer sind durch (fw) und (rev) gekennzeichnet. Die Restriktionsschnittstellen, die an das amplifizierte Produkt angehängen werden, sind angegeben.

2.3.3.2. Standard-Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion wurde zur Amplifizierung von DNA-Abschnitten für präparative und analytische Zwecke genutzt. Die PCR-Reaktionen erfolgten in Abhängigkeit der späteren Verwendung der Produkte in Volumen zwischen 30 und 100 µl. Zur Amplifikation von DNA für präparative und analytische Zwecke wurde die Thermo Scientific® Phusion High Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) verwendet. Standardprotokolle für PCRs sind den Tab. 6 und Tab. 7 zu entnehmen. Das PCR-Programm wurde dabei dem jeweiligen Primer-Paar (Annealing-Temperatur) und Template (Extension-Zeit) angepasst.

Tab. 6: PCR-Reaktions-Ansatz

Bestandteil	30 µl	50 µl	100 µl
Template DNA	0,2 µl	0,25 µl	0,5 µl
5 x HF-Puffer	6 µl	10 µl	20 µl
40 mM dNTPs	0,3 µl	0,5 µl	1 µl
Primer fw/rev (100 pmol/ml)	0,15/0,15 µl	0,25/0,25 µl	0,5/0,5 µl
Phusion® Polymerase	0,15 µl	0,25 µl	0,5 µl
H ₂ O _{bidest}	23,05 µl	38,5 µl	77 µl

Tab. 7: PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	95°C	5 min	
Denaturierung	95°C	30 s	} 30 Zyklen
Annealing	48-60°C	30 s	
Extension	72°C	30 s/kb	
Nachsynthese	72°C	5 min	
Pause	16°C	∞	

2.3.3.3. Site-directed mutagenesis

Zur Substitution, Deletion oder Insertion einzelner oder mehrerer Basenpaare wurde die site-directed mutagenesis-PCR eingesetzt (Liu und Naismith, 2008). Hierbei wurden Primer verwendet, die eine gegenseitig komplementäre Sequenz von mindestens 9 bp am 5'-Ende aufweisen und gemeinsam die gewünschte Mutation einführen. Sie wurden in einer PCR-Reaktion genutzt, bei der das zu mutagenisierende Plasmid komplett amplifiziert wird. Zur Amplifikation wurden die Standardprotokolle verwendet, die in 2.3.3.2. beschrieben sind, wobei eine *Extension*-Zeit von 1 min/kb bei Plasmiden, die größer als 4 kb sind, eingesetzt wurde. Danach wurde der Reaktionsansatz 1 h bei 37°C mit *DpnI* inkubiert, um parentale DNA abzubauen. Anschließend wurden jeweils 1, 2 und 5 µl des Ansatzes in *E. coli* TOP10 transformiert.

2.3.3.4. Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Produkten

Die Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Produkten erfolgte unter Verwendung des ABI BigDye Terminator 3.1 Premix (Thermo Scientific) nach der Kettenabbruchsynthese nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Standardprotokolle für Zusammensetzung und Durchführung der Sequenzierungsreaktion sind den Tab. 8 und Tab. 9 zu entnehmen. Die Analyse der Sequenzierungen erfolgte im hauseigenen Sequenzierlabor (RKI Berlin). Die Auswertung der

Sequenzdaten erfolgte unter Verwendung von Clone Manager Professional 9 (Sci-Ed Software).

Tab. 8: Sequenzierungsansatz

Bestandteil	Volumen
Template DNA	x µl (ca. 300 ng)
ABI-Puffer	2 µl
BigDye 3.1	1 µl
Primer (100 pmol/ml)	0,5 µl
H ₂ O _{bidest}	ad 10 µl

Tab. 9: Sequenzierungsreaktion

Schritt	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	95°C	1:30 min	
Denaturierung	95°C	10 s	} 25 Zyklen
Annealing	52°C	5 s	
Extension	60°C	4 min	
Pause	4°C	∞	

2.3.4. Genomsequenzierung

2.3.4.1. Isolation genomischer DNA von *L. monocytogenes*

Zur Isolation genomischer DNA für die Genomsequenzierung wurden die Bakterienstämme in BHI über Nacht bei 37°C inkubiert. 1 ml der Übernachtskultur wurde durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 5900 x g geerntet. Das Pellet wurde anschließend in 200 µl Lysispuffer resuspendiert und nach Zugabe von 1 µl RNase wurden die Proben für 45 min bei 37°C inkubiert. Die weiteren Schritte zur Isolation der DNA erfolgten nach Herstellerangaben mit dem DNeasy Blood and Tissue Kits (QIAGEN GmbH). Dazu wurden die Proben mit 25 µl Proteinase K und 200 µl AL-Puffer versetzt, auf dem Vortex-Mixer gemischt und weitere 20 min bei 37°C inkubiert. Darauf folgte eine 45-minütige Inkubation bei 56°C. Nach Zugabe von 200 µl Ethanol (100%) wurde der Ansatz gemischt, auf die Säule gegeben und für 1 min bei 5900 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, 200 µl Puffer AW1 auf die Säule gegeben und wie zuvor zentrifugiert. Die Säule wurde mit 200 µl Puffer AW2 gewaschen und nach 3-minütiger Zentrifugation bei 14.000 rpm in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Die DNA wurde anschließend in zweimal 30 µl H₂O_{bidest} eluiert und bei -20°C gelagert.

Lysispuffer:	Tris-HCl, pH8,0	20 mM
	EDTA	2 mM
	Triton X-100	1,2 %
	Lysozym	20 mg/ml

2.3.4.2. DNA-Quantifizierung mittels PicoGreen®

Zur Quantifizierung der isolierten DNA wurde 1 µl Probe mit 99 µl 1 x TE-Puffer verdünnt. Als Standard diente Lambda DNA, die auf 5; 2,5; 1; 0,5; 0,25; 0,1; 0,05; 0,025 und 0,01 µg/ml verdünnt wurde. Zusätzlich wurde eine DNA-freie Probe verwendet. PicoGreen® wurde 1:200 in 1 x TE-Puffer verdünnt. 50 µl der PicoGreen®-Verdünnung wurden jeweils in die Wells einer schwarzen 96-Well-Platte (mit transparentem Boden) vorgelegt und anschließend mit 50 µl der Standardreihe bzw. der Probe gemischt. Anschließend erfolgte die Messung mit dem Fujifilm FLA 2000 (Laser: 473 nm; Filter: Y520). Die DNA-Proben wurden mit DEPC-H₂O (Thermo Scientific) auf 0,2 ng/µl verdünnt.

TE-Puffer:	Tris-HCl pH7,5	200 mM
	EDTA	20 mM

2.3.4.3. Nextera® XT-DNA Probenvorbereitung

Tagmentierung und PCR

Ziel der Tagmentierung ist die Fragmentierung der DNA in 200-3000 bp Fragmente. 10 µl Tagment DNA-Puffer wurden mit 5 µl der DNA vermischt (Endkonzentration: 0,067 ng/µl). Anschließend wurden 5 µl Amplicon Tagment Mix zugegeben und der Ansatz durch fünfmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt. Der Reaktionsansatz wurde 5 min bei 55°C inkubiert und anschließend auf 10°C abgekühlt. Sobald der PCR-Cycler 10°C erreicht hatte, wurden 5 µl Neutralize Tagment Puffer zugegeben, durch Pipettieren gemischt und für 1 min in einer Tischzentrifuge zentrifugiert (1000 x g, RT). Nach einer 1-minütigen Inkubation bei RT wurden pro PCR-Gefäß 15 µl Nextera PCR Master Mix sowie je 5 µl der zwei entsprechenden Indexprimer (N7XX; S5XX) zugegeben, die eine Zuordnung der MiSeq Reads zu den jeweils sequenzierten DNA-Proben ermöglichen. Die PCR-Reaktion wurde wie in Tab. 10 beschrieben durchgeführt.

Tab. 10: PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Zeit	
Extension	72°C	3 min	
Initiale Denaturierung	95°C	30 s	
Denaturierung	95°C	10 s	} 12 Zyklen
Annealing	55°C	30 s	
Extension	72°C	30 s	
Nachsynthese	72°C	5 min	
Pause	10°C	∞	

PCR-Aufreinigung

Die PCR-Produkte wurden mit einer Mehrkanalpipette in eine 96-Well-Platte (Rundboden) übertragen. Nachdem die AMPure XP Beads 30 s mit dem Vortex-Mixer gemischt wurden, wurden je 30 µl zum PCR-Produkt gegeben und durch 10-maliges Pipettieren gemischt. Nach einer Inkubation von 5 min bei RT wurde die Platte auf einen Magnetständer für weitere 2 min inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Die Beads wurden anschließend zweimal mit 200 µl 80%-igem Ethanol (mit DEPC-H₂O frisch hergestellt) gewaschen. Dabei verblieb die 96-Well Platte auf dem Magnetständer. Nachdem der Ethanol möglichst vollständig entfernt wurde, wurden die Beads durch eine 15-minütige Inkubation bei RT getrocknet. Die Platte wurde vom Magnetständer genommen und die Beads mit 52 µl Resuspension Puffer durch mehrfaches Pipettieren gemischt. Nach zweiminütiger Inkubation bei RT wurde die Platte wieder auf den Magnetständer gestellt und für weitere 2 min inkubiert. Der Überstand (= Library) wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt.

Agilent-Elektrophorese (High Sensitivity DNA Chip)

Zur Überprüfung des DNA-Gehaltes und der Fragmentverteilung nach der Tagmentierung wurden die Proben mit Hilfe des Agilent DNA High Sensitivity Chip analysiert. Dazu wurde der Chip in die Chip Priming Station eingelegt. 9 µl des Gel-Dye-Mixes wurde in Well G pipettiert. Anschließend wurde die Spritze auf 1 ml aufgezogen und die Priming Station geschlossen. Der Konus wurde bis unter den Festhalteclip (unterste Position) heruntergedrückt. Nach 60 s wurde der Clip gelöst, 5 s gewartet und der Konus zurück auf 1 ml gezogen. Die Priming Station wurde geöffnet und der Chip auf Luftblasen überprüft. Anschließend wurden je 9 µl Gel-Dye-Mix in die drei übrigen Wells G gegeben. Je 5 µl des Markers wurde in alle 11 Proben-Wells und das Leiter-Well gegeben. 1 µl des High Sensitivity DNA Größenstandards wurde in das Leiter-Well pipettiert und je 1 µl Probe in

eins der 11 Proben-Wells. Der Chip wurde anschließend im Adapter für 1 min bei 2400 rpm geschüttelt und anschließend im Bioanalyzer (Agilent Technologies) analysiert.

Normalisierung

Zur Angleichung der Quantität der Librarys, wurde eine Normalisierung durchgeführt. Dazu wurden 20 µl des aufgereinigten PCR-Produktes in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Nachdem die Beads gründlich gemischt wurden, wurden pro Probe 38 µl Library Normalization Additive 1 (LNA1) und 7 µl Library Normalization Beads 1 (LNB1) zusammenpipettiert. Je 45 µl der LNA1/LNB1-Mischung wurde zum aufgereinigten PCR-Produkt gegeben und für 30 min bei 2000 rpm im Schüttler inkubiert. Die Eppendorf-Gefäße wurden anschließend in einen Magnetständer gestellt. Nach 2 min wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Nach Zugabe von 45 µl Library Normalization Wash-Puffer 1, wurden die Proben 5 min bei 2000 rpm inkubiert, kurz zentrifugiert, für 2 min in den Magnetständer gestellt, der Überstand abgenommen und verworfen. Der Waschschrift wurde ein weiteres Mal wiederholt. Danach erfolgte die Zugabe von 30 µl 0,1 M NaOH. Die Proben wurden für 5 min bei 2000 rpm geschüttelt, in den Magnetständer überführt und 2 min gewartet. In der Zwischenzeit wurde für jede Library 30 µl Library Normalization Storage-Puffer 1 in ein frisches Eppendorf-Gefäß vorgelegt. Die 30 µl Überstand wurden anschließend in die vorbereiteten Reaktionsgefäße überführt.

2.3.4.4. Sequenzierung und Auswertung der Sequenzdaten

Die Sequenzierung der *L. monocytogenes* Genome erfolgte mit dem MiSeq (Illumina) des Fachgebietes 13 unter Verwendung einer v3-Kartusche für einen 2 x 300 bp Lauf. Die Bedienung dieses Gerätes erfolgte durch Dr. Jennifer Bender und Stefan Fiedler. Die Auswertung der Genomdaten erfolgte mit dem Programm Geneious R8 (Biomatters).

2.3.5. DNA-Transfer und Selektion rekombinanter Klone

2.3.5.1. Transformation von *E. coli* (Mandel und Higa, 1970, Sambrook *et al.*, 1989)

Zur Herstellung chemisch-kompetenter Zellen wurde eine 3 ml LB-Übernachtskultur 1:100 in frischem LB (25 ml in 50 ml Falcon-Gefäße) verdünnt und für 2 h bei 37°C und 250 rpm inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,3-0,4 erreicht wurde. Die Zellen wurden anschließend durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 4625 x g und 4°C geerntet. Das erhaltene Zellpellet wurde in 12,5 ml eiskaltem 0,1 M CaCl₂ (sterilfiltriert, in 50 ml Falcon-Gefäß und Verwendung von Reinstwasser, Roth) resuspendiert. Nach 30-minütiger Inkubation der Zellsuspension auf Eis

wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 4625 x g und 4°C für 5 min pelletiert. Das Pellet wurde, je nach Größe, in 0,5-1 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂ resuspendiert. Die Zellen wurden immer frisch hergestellt und sofort für die Transformation eingesetzt. Zur Transformation wurden 50-100 µl kompetente *E. coli*-Zellen mit der gewünschten Menge zu transformierender DNA (Plasmide: 1 µl, Ligationsansatz: 10-20 µl) gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 1 min im Wasserbad und eine 3-minütige Inkubation auf Eis. Nach Zugabe von 900 µl sterilem LB-Medium wurde der Ansatz für 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Der Transformationsansatz wurde auf selektiven LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.3.5.2. Transformation von *L. monocytogenes* durch Elektroporation (Monk *et al.*, 2008)

Zur Herstellung elektrokompeter *Listeria*-Zellen wurde eine BHI-Übernachtskultur 1:100 in 50 ml BHI auf eine OD₆₀₀ von 0,01-0,02 verdünnt. Die Kultur wurde bei 37°C und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,2-0,25 inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von Ampicillin (Endkonzentration 10 µg/ml) und eine weitere Inkubation der Kultur für 2 h bei 37°C. Die Zellen wurden 10 min auf Eis abgekühlt und anschließend 10 min bei 12.857 x g und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 50 ml eiskaltem Sucrose-Glycerol-Waschpuffer (SGWB) resuspendiert. Anschließend erfolgten zwei weitere Zentrifugationsschritte, nach denen das Zellpellet in 17,5 ml bzw. 5 ml SGWB aufgenommen wurde. Nach der Zugabe von 50 µl Lysozym (Stammlösung 10 mg/ml) wurden die Zellen 20 min bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Die Zellen wurden bei 12.857 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert und anschließend in 2,5 ml SGWB resuspendiert. Nach weiterer Zentrifugation wurde das Pellet in 250 µl SGWB resuspendiert und 50 µl Aliquots bei -80°C gelagert. Zur Transformation wurden 25 µl elektrokompeter Zellen mit 1 µg gefällter Plasmid-DNA 5 min auf Eis inkubiert. Nach Transfer in eine 1,5 mm Elektroporationsküvette (Roth) wurden die Zellen bei 330 µF, 4000 Ω, 300 V und der Einstellung „low resistance“ elektroporiert. Die Zellen wurden durch Zugabe von 1 ml sterilem BHI und anschließender Inkubation über 1,5 h bei 37°C (30°C bei pMAD und pAUL-A-Derivaten) ohne Schütteln regeneriert. Die Zellen wurden anschließend abzentrifugiert, auf BHI-Agar mit dem jeweiligen Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C oder zwei Tage bei 30°C bebrütet.

SGWB-Puffer (sterilfiltriert):Glycerin	10%
Sucrose	500 mM
100 mM NaOH	pH7,0 einstellen

2.3.5.3. Deletion von *L. monocytogenes*-Genen

Zur Herstellung von Deletionsmutanten von *L. monocytogenes*, bei denen keine Insertion von exogener DNA wie beispielsweise Antibiotikaresistenzkassetten erfolgt (= clean deletions), wurde die von Arnaud *et al.* beschriebene Methode angewandt (Arnaud *et al.*, 2004). Dazu wurden DNA-Bereiche, die *upstream* und *downstream* eines zu inaktivierenden Gens liegen sowie das Startcodon, eine Restriktionsschnittstelle und das Stoppcodon des Gens fusioniert und in das pMAD-Plasmid kloniert. Das erhaltene pMAD-Derivat wurde anschließend in den jeweiligen *L. monocytogenes*-Stamm elektroporiert und auf BHI-Selektionsplatten, die X-Gal und Erythromycin enthalten, ausplattiert und für 2 Tage bei 30°C inkubiert. Zwei blaue Kolonien wurden zu Einzelkolonien auf die gleichen Selektionsplatten ausgestrichen und für zwei Tage bei 42°C gelagert, um eine Integration des Plasmides in das Chromosom zu erzwingen. 3 ml BHI (ohne Antibiotikum) wurde mit einigen blauen Kolonien dieser Platte angeimpft und für 2 h bei 30°C bei 180 rpm und anschließend für 4 h bei 42°C inkubiert. Die erhöhte Temperatur soll zum Verlust des pMAD-Plasmides führen, da dieses einen hitzesensitiven origin of replication besitzt. Aus der resultierenden Kultur wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt und die Verdünnungen 10^{-3} bis 10^{-5} auf BHI-Platten mit X-Gal ausplattiert. Nach zweitägiger Inkubation bei 42°C wurden alle weißen Kolonien isoliert und auf BHI-Platten gepickt, die X-Gal bzw. X-Gal und Erythromycin enthalten, um weiße Klone zu identifizieren, die durch ein double crossover-Event sowohl das pMAD-Derivat als auch das zu deletierende Gen verloren haben. Die Überprüfung der Klone auf Deletion des Gens und Verlust des Plasmides erfolgte mittels PCR.

2.4. Molekulargenetische Arbeiten mit RNA (Northern-Blot)

2.4.1. Isolation von RNA aus *L. monocytogenes*

Zur Isolation von RNA wurden die zu untersuchenden *L. monocytogenes*-Stämme bis zu einer optischen Dichte ($\lambda=600$ nm) von 1 angezogen. 1,5 ml dieser Kultur wurden für 1 min bei $16.100 \times g$ zentrifugiert und in TE-Puffer resuspendiert, der 3 mg/ml Lysozym enthielt. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde das RNeasy Kit (QIAGEN GmbH) zur Isolation der Gesamt-RNA verwendet und den Instruktionen des Herstellers Folge geleistet.

2.4.2. Denaturierendes RNA-Gel

Zur Herstellung eines denaturierenden RNA-Gels wurden 3 g Agarose mit 146 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ und 20 ml 10 x MOPS-Puffer gemischt, in der Mikrowelle aufgekocht und auf 60°C abgekühlt. Nach dem die Agaroselösung mit 34 ml 35% Formaldehyd, das auf 60°C erwärmt wurde, gemischt wurde, wurde es in eine Gelwanne gegossen. Nach 1 h konnte der Kamm vorsichtig entfernt werden und in die Gelkammer, die mit 1 x MOPS-Puffer gefüllt wurde, gegeben werden. Auf das RNA-Gel wurden 0,8 µg RNA aufgetragen. Als Größenstandard diente der RNA Molecular Weight Marker I (Digoxigenin-markiert, Roche). Die RNA-Proben wurden mit 10 µl RNA-Probenpuffer versetzt (Endvolumen: 20 µl), für 10 min bei 65°C denaturiert und anschließend bis zum Beladen aufs Eis gestellt. Aufgrund der Verwendung von zwei Kämmen pro Gel wurde die Elektrophorese bei 120 V 1,5 h durchgeführt.

10 x MOPS-Puffer	MOPS	41,85 g
	Na-Acetat (Trihydrat)	6,8 g
	Na_2EDTA (H_2O -frei)	3,72 g
RNA-Probenpuffer	Formamid	6,5 ml
	Formaldehyd	1,2 ml
	10 x MOPS	2 ml
	30% Saccharose	0,67 ml
	Bromphenolblau	20 mg
	Xylencyanol FF	20 mg

2.4.3. Vakuumblotting der RNA

Zum Transfer der RNA wurde eine Nylon-Membran (Roche) auf 15 x 15 cm zugeschnitten, gewässert und unter die Maske des Vakuum Blotters (Bio-Rad Laboratories GmbH) gelegt. Dabei war darauf zu achten, dass die Dichtung abgeschlossen ist. Zur Fragmentierung der RNA wurde das Gel 2 min mit UV-Licht bestrahlt. Nachdem der Rahmen des Vakuum Blotters fixiert wurde, wurde das RNA-Gel daraufgelegt, alle Luftblasen entfernt und die Vakuum-Pumpe angeschlossen (5-15 mbar). Das Gel wurde anschließend mit einer Hydrolyseflüssigkeit bedeckt. Nach 5 min wurde die Lösung abgenommen und zur Neutralisation weitere 5 min mit 0,1 M Tris-HCl (pH7,5) inkubiert. Nachdem die Lösung abgesaugt wurde, wurde 20 x SSPE auf das Gel gegeben und nach Bedarf nachgefüllt, damit

das Gel nicht austrocknet. Nach 2-3 h Blotten wurde die Membran kurz auf Filterpapier getrocknet und 30 s mit UV-Licht bestrahlt, um ein crosslinking der RNA zu bewirken. Um das Blot-Ergebnis zu überprüfen, wurde die Membran für ca. 1 min in einer Methylblau-Färbelösung (Lösung wiederverwendbar) geschwenkt, wodurch die ribosomale RNA angefärbt wird. Zur Entfärbung wurde die Membran dreimal mit Wasser gewaschen und auf Filterpapier getrocknet.

Hydrolyseflüssigkeit:	NaOH	50 mM
	NaCl	10 mM
20 x SSPE:	NaCl	3 M
	NaH ₂ PO ₄	0,2 M
	EDTA	0,02 M
	NaOH	pH auf 7,4 einstellen
Methylblau-Färbelösung:	Methylblau	100 mg
	Na-Acetat pH5,2	13,2 ml
	Konzentrierte Essigsäure	2 ml

2.4.4. Herstellung von RNA-Sonden

Zur Herstellung einer *murA*-spezifischen RNA-Sonde wurde das DIG RNA Labeling Kit (Roche) verwendet. Dazu wurde ein ca. 400 bp-Fragment des *murA*-Gens in einer PCR amplifiziert und mit Hilfe der T7-RNA-Polymerase in RNA umgeschrieben. Der Reaktionsansatz ist Tab. 11 zu entnehmen. Der Reaktionsansatz wurde gemischt, für 2 h bei 37°C inkubiert und die Reaktion anschließend durch Zugabe von 0,8 µl 0,5 M EDTA (pH8,0) gestoppt.

Tab. 11: Reaktionsansatz zur Herstellung einer RNA-Sonde

Bestandteil	Volumen
PCR-Produkt	100-200 ng
Labeling mix 5x	4 µl
Transcription buffer 5x	4 µl
T7-RNA-Polymerase	2 µl
RNase-Inhibitor	1 µl
DEPC-H ₂ O (Roth)	ad. 20 µl

2.4.5. Überprüfung der RNA-Sonde und Detektion des Northern Blots

Zur Überprüfung der RNA-Sonde wurde eine Verdünnungsreihe des Ansatzes hergestellt und davon je 1 µl auf eine Nylon-Membran getropft. Zusätzlich wurde noch eine Positivkontrolle (Kontroll-DNA 1 pSPT18-Neo) für die Transkriptionsreaktion und Detektion und eine Negativkontrolle (DEPC-H₂O, Roth) für die Detektion mitgeführt. Die RNA wurde durch crosslinking mittels zweiminütiger UV-Licht-Bestrahlung auf der Membran fixiert. Die Hybridisierung und Detektion der RNA-Sonde und des Northern Blots erfolgte unter Verwendung des DIG Wash and Block Buffer Sets (Roche), eines Anti-Digoxigenin-Antikörpers, der mit einer Alkaline Phosphatase konjugiert ist (Roche), und dem *CDP-Star*-Reagenz (Roche). Dabei wurden die Anweisungen des Herstellers befolgt. Die Signale wurden mit dem Chemilumineszenz-Imager (Chemi-Smart 3000, Vilber Lourmat) detektiert.

2.5. Proteinbiochemische Methoden

2.5.1. Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Zur Expression rekombinanter Proteine wurde eine *E. coli*-Übernachtskultur in 500 ml frischem LB-Medium, das Ampicillin enthält, bis zu einer OD₆₀₀ von 0,05 verdünnt und bei 37°C schüttelnd inkubiert. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 wurde 1 mM IPTG zur Kultur gegeben, um die Proteinsynthese zu induzieren. Nach 2 h Wachstum bei 37°C wurden die Zellen durch 45-minütige Zentrifugation bei 6370 x g und 4°C (Beckman J2-HS, Rotor JA10) geerntet und mit ZAP-Puffer gewaschen. Nach dem die Zellen in 12 ml ZAP-Puffer resuspendiert wurden, wurde PMSF zur Zellsuspension gegeben (Endkonzentration: 1 mM), PMSF dient als Serin-Protease-Inhibitor und verhindert die Degradation der Proteine (Turini *et al.*, 1969). Die Zellen wurden für 3 x 30 s (Power output ~ 40%) mit Ultraschall behandelt und anschließend unter Verwendung des EmulsiFlex C3-Homogenisators (Avestin Europe GmbH) aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 4625 x g und eine anschließende Ultrazentrifugation (Beckman XL-70, Rotor 50Ti) für 30 min bei 56.459 x g bei 4°C abgetrennt.

Zur Aufreinigung von Strep-tag[®] Fusionsproteinen wurde 1 ml Strep-Tactin[®] Superflow (IBA GmbH) in Chromatographie-Säulen (Bio-Rad Laboratories GmbH) gegeben und mit 2 ml Puffer W äquilibriert. Der Zellextrakt wurde auf die Säule gegeben, wodurch das getaggte Protein an der Matrix gebunden wurde. Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch Waschen mit 5 x 1 ml Puffer W entfernt. Das zu reinigende Protein wurde anschließend durch Zugabe von 6 x 500 µl Puffer E eluiert. Das Säulenmaterial wurde mit Hilfe von 3 x 5 ml Puffer R regeneriert. Die Elutionsfraktionen wurden bei -20°C gelagert.

ZAP-Puffer:	Tris-HCl pH7,5	50 mM
	NaCl	200 mM
Puffer W:	Tris-HCl pH8,0	100 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA	1 mM
Puffer E:	Desthiobiotin	2,5 mM
	Puffer W	ad. 10 ml
Puffer R:	2(4-Hydroxyphenylazo)Benzoessäure (HABA)	1 mM
	Puffer W	ad. 1 l

2.5.2. Isolation zellulärer Proteine von *L. monocytogenes*

Zur Isolation zellulärer Proteine wurden *L. monocytogenes*-Stämme in 50 ml BHI-Medium bis zu einer optischen Dichte von $OD_{600}=1$ bei 37°C kultiviert. Die Zellen wurden mittels 5-minütiger Zentrifugation bei 4625 x g und 4°C geerntet, mit ZAP-Puffer gewaschen und anschließend in 1 ml ZAP-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit 10 µl PMSF (100 mM in Ethanol) versetzt. Die Zellen wurden mittels 10-minütigem Ultraschall (Power output ~ 40%) bei 4°C aufgeschlossen. Durch eine 1-minütige Zentrifugation bei 16.100 x g wurden die Zelltrümmer entfernt. Der Überstand wurde anschließend in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und der Proteingehalt bestimmt. Die Proteinlösungen wurden anschließend bei -20°C gelagert.

2.5.3. Fraktionierung von Proteinproben

Zur Fraktionierung der zellulären Proteine in zytoplasmatische Proteinfraction und Membranproteinfraction wurde die Proteinprobe in Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman) überführt. Die Zelllysate wurden für 30 min bei 56.459 x g bei 4°C in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert (Beckman XL-70, Rotor 50Ti). Der Überstand, der die zytoplasmatischen Proteine enthält, wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Das entstandene Pellet, das der Membranfraction entspricht, wurde in 100 µl ZAP-Puffer vorsichtig resuspendiert.

2.5.4. Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Roti[®]-Quant-Lösung 1:5 in H₂O_{bidest} verdünnt (= Bradford-Reagenz). 1 ml Bradford-Reagenz wurden mit 1-5 µl Proteinprobe gut gemischt und für 5 min inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei λ=595 nm gegen Bradford-Reagenz als Leerwert ermittelt. Die gesuchte Proteinkonzentration ergibt sich aus:

$$c[\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \frac{A_{595}}{(0,0536 * x \mu\text{l})}$$

2.5.5. Lineare SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

Die zu untersuchenden Proteinproben wurden 1:1 mit SDS-Probenpuffer gemischt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Zur Abschätzung des Molekulargewichts der aufgetrennten Proteine wurde PageRuler™ Prestained Protein Marker (Thermo Scientific) mit aufgetragen. Er beinhaltet 10 Proteine der Größe 170, 130, 100, 70, 55, 40, 35, 25, 15 und 10 kDa.

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde in einer Mini-PROTEAN[®]3-Kammer (Bio-Rad Laboratories GmbH) durchgeführt. Für die Separierung der Proteinproben wurden SDS-Polyacrylamid-Gele (Laemmli, 1970) gegossen. Die Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels sind Tab. 12 und Tab. 13 zu entnehmen. Je nach Größe der aufzutrennenden Proteine wurden 10, 12,5 oder 15%-ige Gele eingesetzt.

Tab. 12: Zusammensetzung des Trenngels

Trenngel (2 Gele):	10%	12,5%	15%
30% Acrylamid/Bisacrylamid	3,3 ml	4,2 ml	5 ml
1,5 M Tris-HCl, pH8,8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
H ₂ O _{bidest}	4 ml	3,1 ml	2,3 ml
10% SDS	100 µl	100 µl	100 µl
10% APS	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl

Das Gelgemisch wurde nach dem Mischen luftblasenfrei zwischen die beiden Glasplatten gegossen. Um eine ebene Linie zwischen Trenn- und Sammelgel zu erhalten, wurde das Trenngel mit 0,5 ml Wasser beschichtet. Nach dem das Trenngel polymerisiert ist, wurde das Wasser entfernt und das Sammelgel zur Aufnahme der Proben auf das Trenngel gegeben. Anschließend wurde zur Formung von Geltaschen ein Kamm eingesetzt.

Tab. 13: Zusammensetzung des Sammelgels

Sammelgel (2 Gele):	4%
30% Acrylamid/Bisacrylamid	530 µl
0,5 M Tris-HCl, pH6,8	1 ml
H ₂ O _{bidest}	2,4 ml
10% SDS	40 µl
10% APS	50 µl
TEMED	4 µl

Nachdem die Gele in die Mini-PROTEAN[®]3-Kammer überführt wurden, wurde der Geltank vollständig mit 1 x SDS-Lauf-Puffer befüllt. Die SDS-Gelelektrophorese wurde bei 150 V für 60-90 min durchgeführt.

4 x SDS-Probenpuffer: Tris-HCl pH6,8	200 mM
Glycerin	40%
SDS	8%
β-Mercaptoethanol	4%
Bromphenolblau	0,1%
1 x SDS-Laufpuffer: Tris	25 mM
Glycin	0,192 M
SDS	1 g/l

2.5.6. Blue Native PAGE

NativePAGE Novex[®] 4-16% Bis-Tris-Gele (Invitrogen) wurden zur Bestimmung des Oligomerisierungszustands von GpsB verwendet. Dazu wurden 10 µg gereinigtes Protein eingesetzt. Als molekularer Größenmarker diente der NativeMark[™] unstained protein standard (Novex). Die Durchführung der Gelelektrophorese erfolgte entsprechend der Herstellerangaben.

2.5.7. Gelfärbung mit Coomassie

Zur Visualisierung der Proteinbanden wurde das SDS-Polyacrylamidgel für 10 min in einer Fixierlösung inkubiert und die Banden anschließend über Nacht mit einer Coomassie-Färbelösung angefärbt. Zur Entfärbung des Hintergrundes wurde das Gel mit Wasser inkubiert bis ein optimales Färbeergebnis erreicht wurde.

Fixierlösung:	Methanol	45%
	Essigsäure	15%
Coomassie-Färbelösung:	5 x Roti [®] -Blue	20 ml
	Methanol	20 ml
	H ₂ O _{bidest}	60 ml

2.5.8. Westernblot

Der Transfer von Proteinen aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Immobilon[®]-P^{SQ} Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF, Merck Millipore GmbH) erfolgte mit Hilfe einer Hoefer Semi-Dry-Blot-Apparatur. Das SDS-Polyacrylamidgel wurde nach der Gelelektrophorese 30 s in Transferpuffer äquilibriert. Währenddessen wurde die PVDF-Membran auf Gelgröße zugeschnitten, kurz mit 100% Methanol inkubiert und anschließend mit Wasser gespült. Vier Lagen Whatman-Papier (Whatman[™] Grade GB003; GE Healthcare) wurden ebenfalls auf Gelgröße zugeschnitten und in Transferpuffer getränkt. In der Blotapparatur (Hoefer) wurden drei Lagen Whatman-Papier, die Membran, das SDS-Polyacrylamidgel und drei weitere Lagen Whatman-Papier luftblasenfrei übereinander gelegt. Der Elektrottransfer der Proteine erfolgte bei 50 mA (0,8 mA/cm²) für 1-2 h.

Transferpuffer:	Methanol	15%
	1 x SDS-Laufpuffer	ad. 1 l

2.5.9. Proteinnachweis durch Immunodetektion

Nach dem Transfer der Proteine wurde die PVDF-Membran über Nacht in Blocking-Lösung bei RT oder 4°C inkubiert. Die Inkubation mit dem polyklonalen Antikörper (AK) gegen das jeweilige Protein erfolgte für 2 h bei RT. Dafür wurden die verschiedenen Antikörper entsprechend ihrer Spezifität in Blocking-Lösung verdünnt eingesetzt (Tab. 14). Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 min mit Blocking-Lösung gewaschen. Die Membran wurde danach mit dem jeweiligen sekundären Antikörper 30-90 min inkubiert, der 1:10.000 verdünnt wurde. Vor der Detektion wurde die Membran zweimal für 10 min mit Blocking-Lösung und einmal für 10 min mit 1 x PBS gewaschen. Die Membran wurde anschließend in eine Petrischale gelegt und mit 1 ml eines 50:50 Gemisches ECL-Substrat (enhanced chemiluminescence substrate, Thermo Scientific) benetzt. Die überschüssige Flüssigkeit wurde mit Hilfe eines Tuchs entfernt und die Membran luftblasenfrei zwischen eine Folie

gelegt. Die Detektion erfolgte im Chemilumineszenz-Imager (Chemi-Smart 3000, Vilber Lourmat) für 1 bis 20 min und die Auswertung erfolgte mit dem Programm Chemi-Capt (Vilber Lourmat).

Tab. 14: Übersicht über die verwendeten polyklonalen Antikörper

Bezeichnung	Antikörper-Typ	Antigen	Verdünnung	Hersteller
<u>Primärer Antikörper</u>				
Anti-GpsB	Kaninchen-IgG	GpsB (<i>L. monocytogenes</i>)	1:1000	diese Arbeit
Anti-DivIVA	Kaninchen-IgG	DivIVA (<i>B. subtilis</i>)	1:5000	(Marston <i>et al.</i> , 1998)
Anti-GFP	Kaninchen-IgG	GFP	1:3500	Invitrogen
Anti-MurAA	Kaninchen-IgG	MurAA (<i>B. subtilis</i>)	1:5000	(Kock <i>et al.</i> , 2004)
<u>Sekundärer Antikörper</u>				
Anti-Kaninchen-IgG	Anti-Ziege-IgG	Kaninchen-IgG	1:10.000	Sigma
Anti-Maus-IgG	Anti-Ziege-IgG	Maus-IgG	1:10.000	Sigma

1 x PBS:	NaCl	8 g
	KCl	0,2 g
	KH ₂ PO ₄	0,2 g
	Na ₂ HPO ₄	1,145 g
	H ₂ O _{bdest}	ad. 1 l
Blocking-Lösung:	Magermilch	2,5%
	Tween 20	0,1%
	1 x PBS	ad. 1 l

2.5.10. PBP-Fluoreszenzgel

Zur Untersuchung der Expression der Penicillin-bindenden Proteine in *L. monocytogenes* wurde ein Fluoreszenz-markiertes Penicillin (Bocillin™ FL Penicillin, Molecular Probes) eingesetzt, das von den PBPs gebunden wird (Zhao *et al.*, 1999). Dazu wurden Membranfraktionen wie in 2.5.3. beschrieben isoliert. 10 µg Protein wurden mit 3 µM Bocillin™ FL Penicillin für 20 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von SDS-Probenpuffer wurde die Reaktion gestoppt. Nach 5-minütiger Inkubation bei 65°C wurden die Proben in einem SDS-Gel, dessen Zusammensetzung in Tab. 15 beschrieben ist, aufgetrennt. Die

Visualisierung der Fluoreszenzsignale erfolgte mit dem Fujifilm FLA 2000 bei 473 nm (Laser: 473 nm; Filter: Y520).

Tab. 15: Zusammensetzung des Trenngels

Trenngel (2 Gele):	8%
Acrylamid	2,6 ml
Bisacrylamid	335 µl
1,5 M Tris-HCl, pH8,8	2,6 ml
H ₂ O _{bidest}	4,25 ml
10% SDS	100 µl
10% APS	100 µl
TEMED	10 µl

Die Zusammensetzung des Sammelgels ist in Tab. 13 beschrieben.

2.6. Das Bacterial Two-Hybrid-System (B2H-System)

Das B2H-System ermöglicht ein *in vivo* Screening für funktionelle Interaktionen zwischen zwei Proteinen. Dazu werden die beiden zu untersuchenden Proteine mit zwei komplementären Fragmenten, T25 und T18, die die katalytische Domäne der *Bordetella pertussis* Adenylatcyclase entsprechen, fusioniert und in einen *E. coli cya* Stamm (BTH101) transformiert. Bei vorliegender Interaktion beider Proteine wird die Adenylatcyclase wieder hergestellt und die cAMP-Synthese erfolgt. Dies wiederum führt zur transkriptionellen Aktivierung des *lacZ*-Gens und resultiert in einer Blaufärbung der Kolonien (Karimova *et al.*, 1998, Ladant und Ullmann, 1999). Zur Durchführung des B2H-Assays wurden chemisch kompetente BTH101-Zellen hergestellt. In einer 96-well-Platte wurde je 1 µl der T18-Plasmide in die waagerechten Reihen und je 1 µl der T25-Plasmide in die senkrechten Reihen gegeben und mit 10 µl kompetenten Zellen vermischt. Die Transformation erfolgte wie in 2.3.5.1. beschrieben. Nach Zugabe von 90 µl LB-Medium wurden die Zellen bei 30°C für 2 h inkubiert. Anschließend wurden je 6 µl des Transformationsansatzes auf B2H-Agarplatten getropft. Die Platten wurden nach 1-2-tägiger Inkubation bei 30°C fotografiert. Blaue Kolonien weisen hierbei auf eine Protein-Protein-Interaktion hin, wohingegen bei weißen Kolonien keine Interaktion nachgewiesen werden konnte. Zur Kontrolle wurden die T18(pUT18)/T25(pKT25)-Leervektoren mitgeführt.

B2H-Agarplatten:	LB-Agar mit	
	IPTG	0,1 mM
	X-Gal	50 µg/ml
	Kanamycin	25 µg/ml
	Ampicillin	100 µg/ml

2.7. Methoden zur phänotypischen Charakterisierung

2.7.1. Wachstumskurven

Zur Bestimmung des Wachstumsverhalten verschiedener *Listeria*-Stämme wurde eine BHI-Kultur aus einer Vorkultur auf eine $OD_{600}=0,05$ angeimpft und bei 30°C, 37°C oder 42°C inkubiert. Das Medium wurde gegebenenfalls mit 1 mM IPTG versetzt. Konditionelle Deletionsmutanten, die ohne Zugabe von IPTG in der Vorkultur nicht wachsen können, wurden vor Verwendung für die Hauptkultur mit BHI gewaschen. Das Wachstum wurde anschließend durch stündliche Messung der optischen Dichte (OD_{600}) verfolgt.

2.7.2. Autolyse-Assay

Zur Untersuchung der Autolyse der Zellen wurde eine BHI-Kultur (10-20 ml) auf eine OD_{600} von 0,05 aus einer Vorkultur angeimpft und wenn nötig mit IPTG versetzt. Die Zellen wurden bei 37°C bis zu einer OD_{600} von 0,6-0,8 inkubiert und durch Zentrifugation (5 min 4629 x g bei RT) geerntet. Anschließend wurden die Zellen in 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) aufgenommen. Gegebenenfalls wurde die optische Dichte der einzelnen Stämme einander angepasst. Nach Zugabe von 25 µg/ml Penicillin G bzw. 2,5 µg/ml Lysozym wurde die optische Dichte alle 30 min (Penicillin G) bzw. alle 15 min (Lysozym) gemessen.

2.7.3. Antibiotika-Suszeptibilitäts-Test

Zur Bestimmung der Antibiotika-Suszeptibilität wurden folgende Teststreifen der Firma bestbion dx verwendet: Amoxicillin (0,016-256 µg/ml), Ampicillin (0,016-256 µg/ml), Gentamycin (0,016-256 µg/ml), Meropenem (0,002-32 µg/ml), Penicillin (0,016-256 µg/ml) und Vancomycin (0,016-256 µg/ml). Die Teststreifen wurden vor Benutzung etwa eine Stunde bei Raumtemperatur gelagert. 4-5 isolierte und morphologisch ähnliche Kolonien wurden mit einer Impföse abgenommen und in 5 ml BHI-Medium resuspendiert. Anschließend wurde ein steriler Tupfer in die Suspension getaucht und gegen die Röhrchenwand gedrückt, um überschüssige Flüssigkeit zu entfernen. Mit dem Tupfer wurde dann eine Agarplatte gleichmäßig ausgestrichen. Nach dem die Oberfläche der Agarplatte

getrocknet war, wurde der Streifen mit der Skala nach oben auf die Agaroberfläche gelegt und mit einer Pinzette angedrückt. Die Platten wurden anschließend umgedreht und über Nacht bei 37°C bebrütet. Zur Bestimmung der Fosfomycinresistenz wurde eine Fosfomycin-Lösung (20 mg/ml) auf Whatman Filter discs (GE Healthcare) pipettiert, die anschließend auf die beimpfte Agaroberfläche gelegt wurden. Die Platten wurden wie oben beschrieben inkubiert.

2.7.4. Licht- und Fluoreszenzmikroskopie

Zur mikroskopischen Analyse von Bakterienstämmen wurden 0,5 µl einer exponentiell wachsenden Bakterienkultur auf einen Objektträger getropft, der mit einem Agarosefilm (1,5% Agarose in H₂O) beschichtet wurde. Die Proben wurden getrocknet, mit einem Deckglas abgedeckt und anschließend im Phasenkontrastmodus des Fluoreszenzmikroskops untersucht. Zur Färbung der Zellmembran wurden exponentielle Bakterienkulturen mit 1 µl Nilrot-Lösung (100 mg/ml in DMSO) versetzt, für 10 min bei 37°C schüttelnd inkubiert und auf den Objektträger gegeben. Zur Detektion der Penicillin-bindenden Proteine wurden Bakterienzellen mit 0,5 µl Bocillin™ FL Penicillin (1 mg/ml, Molecular Probes) für 20 min bei 37°C inkubiert, mit BHI gewaschen und anschließend mikroskopisch analysiert. Zur Visualisierung der naszierenden Zellwandsynthese wurden 3 µl Van-FL (100 µg/ml, Molecular Probes) zu den Zellen gegeben und wie für Bocillin™ FL Penicillin beschrieben behandelt. Die Bilder wurden mit dem Nikon Eclipse Ti-Mikroskop aufgenommen, das an eine Nikon DS-MBWc CCD Kamera gekoppelt ist. Die Aufnahme und Verarbeitung der Bilder erfolgte mit Hilfe der Software NIS-Elements AR (Nikon) oder ImageJ. Zur Bestimmung der Zelllänge wurden 300 Zellen mit Hilfe der Software NIS-Elements AR und dem darin vorhandenen Längenmesstools gemessen.

2.7.5. Probenvorbereitung für Transmissions- und Rasterelektronenmikroskopie

Zur Durchführung der Transmissions- (TEM) und Rasterelektronenmikroskopie (REM) durch die Kooperationspartner Lars Möller, Gudrun Holland und Petra Kaiser wurden die ausgewählten Stämme bis zur mittleren logarithmischen Wachstumsphase bei 37°C in BHI-Medium angezogen. Nach zweiminütiger Zentrifugation bei 4629 x g wurde das Zellpellet in 1 ml Fixativ aufgenommen. Die Zellen wurden für 2 h bei RT fixiert und bis zur Analyse bei 4°C gelagert.

Fixativ:	HEPES, pH7,4	0,05 M
	Paraformaldehyd	1%
	Glutaraldehyd	2,5%

2.8. Infektionsexperimente

2.8.1. Bestimmung der Invasionsrate und der intrazellulären Replikation in HeLa-Zellen

Zur Bestimmung der Invasionsrate von *Listeria*-Stämmen, wurden 10^5 HeLa-Zellen in eine 24-Well-Kulturschale ausgesät und in 1 ml DMEM-Medium (Lonza), das mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) versetzt wurde, bei 37°C und 5% CO₂ für einen Tag kultiviert. Wenn es für die Infektionsexperimente notwendig war, wurden die HeLa-Zellen zusätzlich mit 1 mM IPTG inkubiert, um die Anwesenheit von IPTG in den HeLa-Zellen während der gesamten Infektion zu gewährleisten. Die *L. monocytogenes* Stämme wurden über Nacht bei 37°C in BHI, wenn nötig unter Zugabe von 1 mM IPTG, angezogen. Bei der Untersuchung der Invasionsrate wurde mit logarithmisch wachsenden Bakterienkulturen gearbeitet. Daher wurden die Stämme in frischem BHI verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bei 37°C inkubiert. Für die Infektion wurde anschließend das Inokulum auf OD₆₀₀=0,2 eingestellt und 1:100 in frischem DMEM (ohne FCS) verdünnt. Nachdem das Zellkulturmedium der HeLa-Zellen vorsichtig entfernt wurde, wurden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml des Inokulums bedeckt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 800 rpm (Heraeus Labofuge 400, Rotor 8177) erfolgte die Invasion der Bakterien in die HeLa-Zellen während einer einstündigen Inkubation bei 37°C und 5% CO₂. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, die extrazellulären Bakterien wurden infolge einer einstündigen Inkubation in DMEM (ohne FCS), das 40 µg/ml Gentamycin enthielt, getötet. Zur Probenentnahme wurde das Zellkulturmedium entfernt und die Zellen durch Inkubation mit eiskaltem Lysepuffer lysiert. Anschließend wurde eine adäquate Verdünnungsreihe auf BHI-Agarplatten ausplattiert und die gewachsenen Kolonien am nächsten Tag ausgezählt.

Für die Bestimmung der intrazellulären Replikation wurde eine Übernachtskultur der *Listeria*-Stämme zur Infektion eingesetzt, die wie oben beschrieben verdünnt wurden. Nach dem Abtöten der extrazellulären Bakterien durch Gentamycin wurden die Zellen mit frischem DMEM (ohne FCS) überschichtet, das 10 µg/ml Gentamycin enthielt und Proben zur Messung der intrazellulären Bakterienzahl wurden nach 2, 4 und 6 h Inkubation bei 37°C wie beschrieben entnommen und ausplattiert.

DMEM:	Glucose	4,5 g/l
	Natriumpyruvat	110 mg/l
	L-Glutamat	584 mg/l
Lysepuffer:	Triton X-100	0,1%
	1 x PBS (steril)	ad. 50 ml

2.8.2. Bestimmung der intrazellulären Replikation in J774.A1-Mausmakrophagen

Zur Untersuchung des intrazellulären Wachstums der *Listeria*-Stämme in Makrophagen wurden J774.A1-Mausmakrophagen (ATCC[®] TIB-67TM) verwendet. Ein Tag vor der Infektion wurden 3×10^5 Makrophagen in eine 24-Well-Kulturschale ausgesät, welche 1 ml DMEM-Medium und 10% FCS enthielt, und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die *Listeria*-Stämme wurden über Nacht bei 37°C angezogen, am nächsten Morgen mit frischem BHI-Medium auf eine OD₆₀₀=0,2 eingestellt und anschließend 1:100 in DMEM (ohne FCS) verdünnt. Die Infektion, die Gentamycinbehandlung und die Zellernte erfolgten wie bereits für HeLa-Zellen beschrieben. Da J774.A1-Mausmakrophagen eine verringerte Adhärenz zu den Zellkulturschalen aufweisen, wurde lediglich einmal mit PBS nach Infektion und Gentamycinbehandlung gewaschen.

2.8.2. Plaque-Formation-Assay zur Bestimmung der Ausbreitung von Zelle zu Zelle

Die embryonalen Maus-Fibroblasten-Zelllinie 3T3 L1 wurde eingesetzt, um die Zell-zu-Zell-Ausbreitung von *L. monocytogenes* zu untersuchen. Der hierzu verwendete Plaque-Formation-Assay wurde nach Marquis durchgeführt (Marquis, 2006). Zwei Tage vor der Infektion wurden 4×10^6 Zellen in eine 6-Well-Kulturschale ausgesät, mit 3 ml DMEM + 10% FCS versetzt und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die *Listeria*-Stämme wurden über Nacht bei 37°C kultiviert und anschließend in frischem BHI bis auf eine OD₆₀₀=0,05 verdünnt. Da für das Plaque-Formation-Assay mit logarithmisch wachsenden Bakterien gearbeitet wurde, wurden sie bis zu einer OD₆₀₀=0,4 bei 37°C inkubiert, auf eine OD₆₀₀=0,2 verdünnt und 1:100 in DMEM (ohne FCS) verdünnt. Die 3T3-Zellen wurden vor der Infektion dreimal mit PBS gewaschen und mit 2 ml frischem DMEM (ohne FCS) überschichtet. Die Zellen wurden dann mit 10, 4 und 1 µl pro Well des Inokulums der jeweiligen Stämme beimpft und für 1 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden 2 ml Overlay A auf die Zellen aufgetragen. Nach 3 Tagen wurden

2 ml Overlay B auf die Zellen gegeben. Nach ca. 6-stündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ konnten die Plaques fotografiert werden.

Overlay A:	2 x DMEM	13,5 ml
	FCS	1,5 ml
	50 mg/ml Gentamycin	6 µl
	0,7% low melting point (LMP) Agarose	15 ml
Overlay B:	2 x DMEM	13,5 ml
	FCS	1,5 ml
	50 mg/ml Gentamycin	9 µl
	0,7% low melting point (LMP) Agarose	15 ml
	1 N NaOH	175 µl
	0,03 % Neutralrot	900 µl

3. Ergebnisse

3.1. Biochemische Charakterisierung von GpsB

3.1.1. Aufreinigung von GpsB

Das Gen *lmo1888* aus *L. monocytogenes* codiert für GpsB (*LmGpsB*), dessen Proteinsequenz eine Identität von 58% zu GpsB von *B. subtilis* (*BsGpsB*), 58% zu GpsB von *S. pneumoniae* und 44% zu GpsB von *S. aureus* hat. Die N-terminale Domäne (AS1-69) von GpsB weist eine hohe Konservierung zwischen den einzelnen Spezies auf, während die Linker-Region (AS70-89) weniger konserviert ist (Abb. 5A). Diese Linker-Region ist spezifisch für GpsB-Proteine und in DivIVA-Proteinen nicht vorhanden. Der C-Terminus von GpsB ist in den Firmicutes ebenfalls stark konserviert, jedoch deutlich kürzer als die C-terminale Region von DivIVA (Abb. 5A).

Zur Herstellung eines GpsB-spezifischen polyklonalen Antikörpers wurde GpsB als Strep-tag-Fusionsprotein aufgereinigt. Dazu wurde *gpsB-strep* im *E. coli*-Stamm BL21 überexprimiert. Nach Aufschluss der Zellen mit Hilfe des EmulsiFlex C3-Homogenisators (Avestin Europe GmbH) wurde GpsB-Strep wie im Material- und Methodenteil beschrieben aufgereinigt. Zur Überprüfung der Aufreinigung wurden jeweils 5 µl des Zelllysates und des Durchflusses und je 10 µl der ersten und der letzten Waschfraktion sowie der Elutionsfraktionen in einer SDS-PAGE aufgetragen und analysiert. GpsB-Strep konnte demnach erfolgreich aufgereinigt werden, allerdings sind einige andere Proteine ebenfalls in den Elutionsfraktionen enthalten (Abb. 5B). Aus einer 500 ml LB-Kultur konnten ca. 6 mg GpsB-Strep gewonnen werden. Zur Herstellung des GpsB-spezifischen Antikörpers wurden 400 µg des aufgereinigten GpsB-Strep-Fusionsproteins zur Firma BJ Diagnostik geschickt. Der Antikörper wurde in Kaninchen nach einem 3-Monatsprotokoll produziert. Das erhaltene Antiserum wurde in einem Westernblot auf seine Spezifität überprüft (Daten nicht gezeigt).

3.1.2. Oligomerisierung von GpsB

In Blue-Native PAGE-Gelen wies GpsB-Strep ein Molekulargewicht von ca. 64 ± 3 kDa auf. Das Monomer besitzt eine Größe von 14 kDa (Abb. 5C). Daher ist davon auszugehen, dass das beobachtete GpsB-Oligomer entweder etwas zu hoch läuft und einem Tetramer entspricht, oder etwas zu niedrig läuft und einem Penta- oder Hexamer entspricht. Eine um die C-terminale Domäne verkürzte GpsB-Variante (GpsB Δ CTD-Strep) besitzt ein Molekulargewicht von 11 kDa und läuft im SDS-Gel auf der erwarteten Höhe (Abb. 5C). Im BN-PAGE-Gel konnte für GpsB Δ CTD-Strep eine Größe von ca. 27 ± 3 kDa bestimmt werden, was einem Dimer entsprechen könnte (Abb. 5D). Durch Größenausschluss-Chromatographie

gekoppelt mit multi-angle laser light scattering (SEC-MALLS) konnten die Kooperationspartner Prof. Dr. Richard J. Lewis und Dr. Robert M. Cleverley (Newcastle University) zeigen, dass *BsGpsB* in Lösung ein Hexamer bildet (Rismondo *et al.*, 2015a). Die N-terminalen Domänen von *BsGpsB*, *BsGpsB*¹⁻⁶⁸, bilden ein Dimer, wohingegen die C-terminalen Domäne von *BsGpsB*, *BsGpsB*⁶⁹⁻⁹⁸, als Trimer vorliegt (Rismondo *et al.*, 2015a). Diese Ergebnisse decken sich mit den hier beobachteten Molekulargewichten von GpsB-Strep und GpsBΔCTD-Strep, die auf Grundlage der BN-PAGE berechnet wurden.

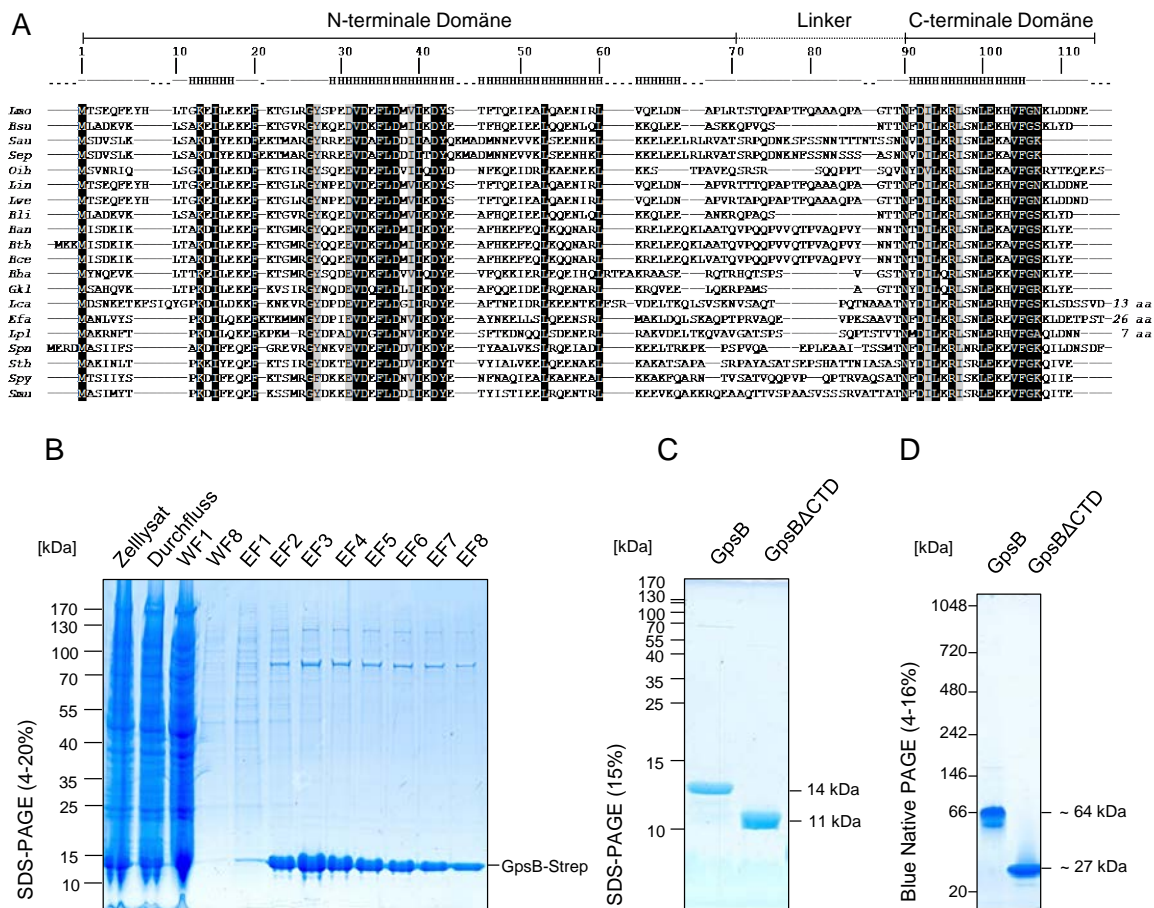


Abb. 5: Oligomerisierung von GpsB aus *L. monocytogenes*

(A) Sequenzalignement von GpsB aus verschiedenen Organismen. Sequenzübereinstimmungen sind durch schwarze Boxen visualisiert, Sequenzähnlichkeiten durch graue. Die Nummerierung der Aminosäuren erfolgte entsprechend zu *L. monocytogenes* (*Lmo*) GpsB. Abkürzungen: *Bsu* – *Bacillus subtilis*, *Sau* – *Staphylococcus aureus*, *Sep* – *Staphylococcus epidermidis*, *Oih* – *Oceanobacillus ihyensis*, *Lin* – *Listeria innocua*, *Lwe* – *Listeria welshimeri*, *Bli* – *Bacillus licheniformis*, *Ban* – *Bacillus anthracis*, *Bth* – *Bacillus thuringiensis*, *Bce* – *Bacillus cereus*, *Bha* – *Bacillus halodurans*, *Gkl* – *Geobacillus kaustophilus*, *Lca* – *Lactobacillus casei*, *Efa* – *Enterococcus faecalis*, *Lpl* – *Lactobacillus plantarum*, *Spn*, *Streptococcus pneumoniae*, *Sth* – *Streptococcus thermophilus*, *Spy* – *Streptococcus pyogenes*, *Smu* – *Streptococcus mutans*. (B) Waschfraktionen (WF) und Elutionsfraktionen (EF) der affinitätschromatographischen Aufreinigung von GpsB-Strep wurden in einem SDS-PAGE-Gel (4-20% Acrylamid) aufgetrennt. Zusätzlich wurde eine Probe des Zelllysates und des Durchflusses aufgetragen. (C) SDS-PAGE-Gel (15% Acrylamid) mit aufgereinigtem GpsB-Strep und GpsBΔCTD-Strep. (D) Blue-Native PAGE Gel (4-16% Acrylamid) mit aufgereinigtem GpsB-Strep und GpsBΔCTD-Strep.

3.1.3. Lokalisierung von GpsB

Um die subzelluläre Lokalisation von GpsB zu bestimmen, wurden zytoplasmatische Proteine von der Membranproteinfraktion getrennt und im Westernblot auf Anwesenheit von GpsB getestet. Zu Vergleichszwecken wurde die DivIVA-Menge in den gleichen Fraktionen in einem parallelen Westernblot bestimmt. Dieses Experiment ergab, dass GpsB, wie auch DivIVA, hauptsächlich in der Membranfraktion zu finden ist und nur zu geringen Teilen in der zytoplasmatischen Fraktion detektiert wird. Zur Überprüfung der verwendeten Separationsmethode wurden Extrakte des GFP-exprimierenden Stammes LMS10 mitgeführt, da GFP ein zytoplasmatisches Protein ist (Abb. 6A). Es zeigte sich, dass GFP ausschließlich in der zytoplasmatischen Proteinfraktion nachweisbar war. Folglich ist GpsB ein sich in der Membranfraktion anreicherndes Protein.

Für *BsDivIVA* konnte gezeigt werden, dass die Aminosäure F17 für die Insertion in die Membran verantwortlich ist und R18 zur Stabilisierung dieser Insertion dient (Oliva *et al.*, 2010). In *LmGpsB* sind die entsprechenden Aminosäuren L24 und R25. Um den Einfluss dieser Aminosäureseitenketten auf die Membranbindung zu testen, wurden die Stämme LMJR68 (*gpsBL24A*) und LMJR4 (*gpsBR25A*) dem gleichen Separationsprotokoll unterworfen. Beide Proteine konnten nur in der zytoplasmatischen Fraktion nachgewiesen werden. Die Mutation dieser Aminosäuren zu Alanin verhinderte demnach die Insertion von GpsB in die Membran (Abb. 6B). Beide Aminosäuren scheinen daher auch in *LmGpsB* für die Insertion in die Zellmembran verantwortlich zu sein.

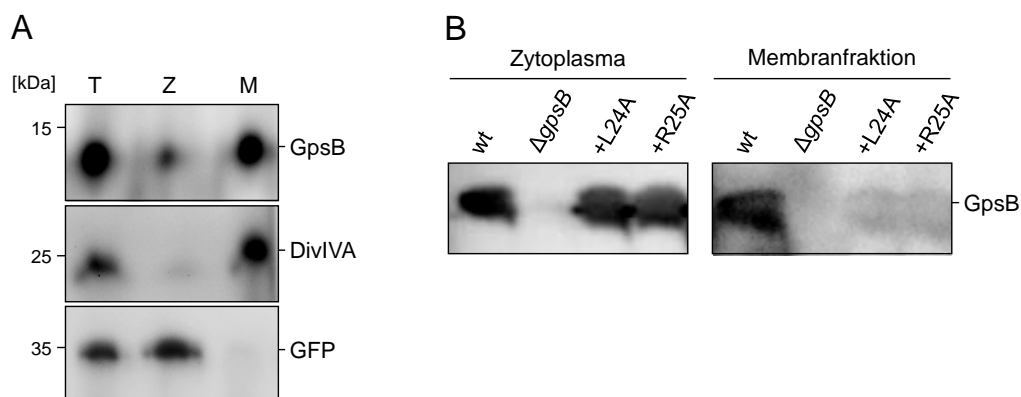


Abb. 6: Subzelluläre Lokalisation von *L. monocytogenes* GpsB

(A) Westernblot-Analyse von Zytoplasma- und Membranproteinfraktionen zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation von GpsB. Der *L. monocytogenes* Wildtypstamm EGD-e wurde in BHI-Medium bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀=1 angezogen und lösliche Proteine von Membranproteinen, wie im Material- und Methodenteil beschrieben, getrennt. Die Fraktionen wurden anschließend in Westernblots unter Verwendung von Antikörpern, die GpsB (oben) und DivIVA (Mitte) erkennen, getestet. Das vom Stamm LMS10 konstitutiv exprimierte GFP diente als Markerprotein für die lösliche zytoplasmatische Proteinfraktion und wurde mit Hilfe eines GFP-spezifischen Antikörpers detektiert (unten). T – zellulärer Proteinextrakt, Z – Zytoplasmaproteinfraktion, M – Membranproteinfraktion. (B) Einfluss der L24A und R25A Mutation auf die Membranassoziation von GpsB. Zytoplasma- und Membranfraktionen der Stämme EGD-e (wt), LMJR19 (Δ *gpsB*), LMJR68 (*gpsBL24A*) und LMJR4 (*gpsBR25A*) wurden mit Hilfe eines Westernblots unter Verwendung eines GpsB-spezifischen Antikörpers analysiert.

3.2. Generierung und Charakterisierung einer Δgpb -Deletionsmutante

3.2.1. Wachstumsdefekt einer *L. monocytogenes* Δgpb -Mutante

Zur Deletion des *gpb*-Gens von *L. monocytogenes* wurde das pMAD-Deletionssystem verwendet (Arnaud *et al.*, 2004). Mehrere Versuche, *gpb* im Wildtyp-Hintergrund mit Hilfe des *gpb*-Deletionsplasmids pSH246 zu deletieren, scheiterten, wodurch die Vermutung entstand, dass es sich bei *gpb* um ein essenzielles Gen handeln könnte. Um diese Vermutung zu testen, wurde eine konditionale *gpb*-Mutante hergestellt. Dazu wurde *gpb* in das Plasmid pIMK3 kloniert, das einen IPTG-induzierbaren Promotor (P_{help}) besitzt und in die *attB* tRNA^{Arg}-Region des Wildtypstammes EGD-e integriert. In diesem Stamm gelang anschließend die Deletion des *gpb*-Gens mit Hilfe des pSH246-Plasmids in Anwesenheit von IPTG. In Wachstumsexperimenten stellte sich heraus, dass der resultierende Stamm LMS56 (*Igpb* – I steht für IPTG-induzierbar) in Abwesenheit von IPTG bei 37°C einen Wachstumsdefekt aufweist und bei 42°C nicht wachsen konnte (Abb. 7B-C). Beim pMAD-Deletionssystem werden jedoch mehrere Kultivierungen bei 42°C durchgeführt, um die Replikation des pMAD-Plasmids zu unterdrücken, was möglicherweise der Grund für das Scheitern der Deletion des *gpb*-Gens im Wildtypstamm ist. Daher wurde versucht, *gpb* im Wildtypstamm mit 37°C als nicht-permissiver Temperatur zur Unterdrückung der pSH246-Replikation zu deletieren. Bei dieser Temperatur konnte wie erwartet eine Δgpb -Deletionsmutante generiert werden. Wachstumskurven zeigten, dass die Deletion von *gpb* bei 30°C keinen Einfluss auf das Wachstum hat (Abb. 7A). Die Δgpb -Mutante und der IPTG-induzierbare Stamm LMS56 wiesen jedoch in Abwesenheit von IPTG einen Wachstumsdefekt bei 37°C auf (Abb. 7B). Bei 42°C hingegen ist die Abwesenheit von GpsB letal (Abb. 7C). Zur Überprüfung der GpsB-Synthese in den Stämmen EGD-e (wt), LMJR19 (Δgpb) und LMS56 (*Igpb*) wurde ein Westernblot mit einem GpsB-spezifischen Antikörper durchgeführt (Abb. 7D). Die Abwesenheit von GpsB im Stamm LMJR19 und die IPTG-abhängige Expression von *gpb* im Stamm LMS56 konnte dadurch bestätigt werden. Die GpsB-Proteinlevel des Stammes EGD-e und der konditionalen Mutante LMS56 in Anwesenheit von IPTG sind miteinander vergleichbar (Abb. 7D). Das zeigt, dass die Wachstumsdefekte der Stämme LMJR19 (Δgpb) und LMS56 (*Igpb*) bei 37°C und 42°C auf die Abwesenheit von GpsB zurückzuführen sind.

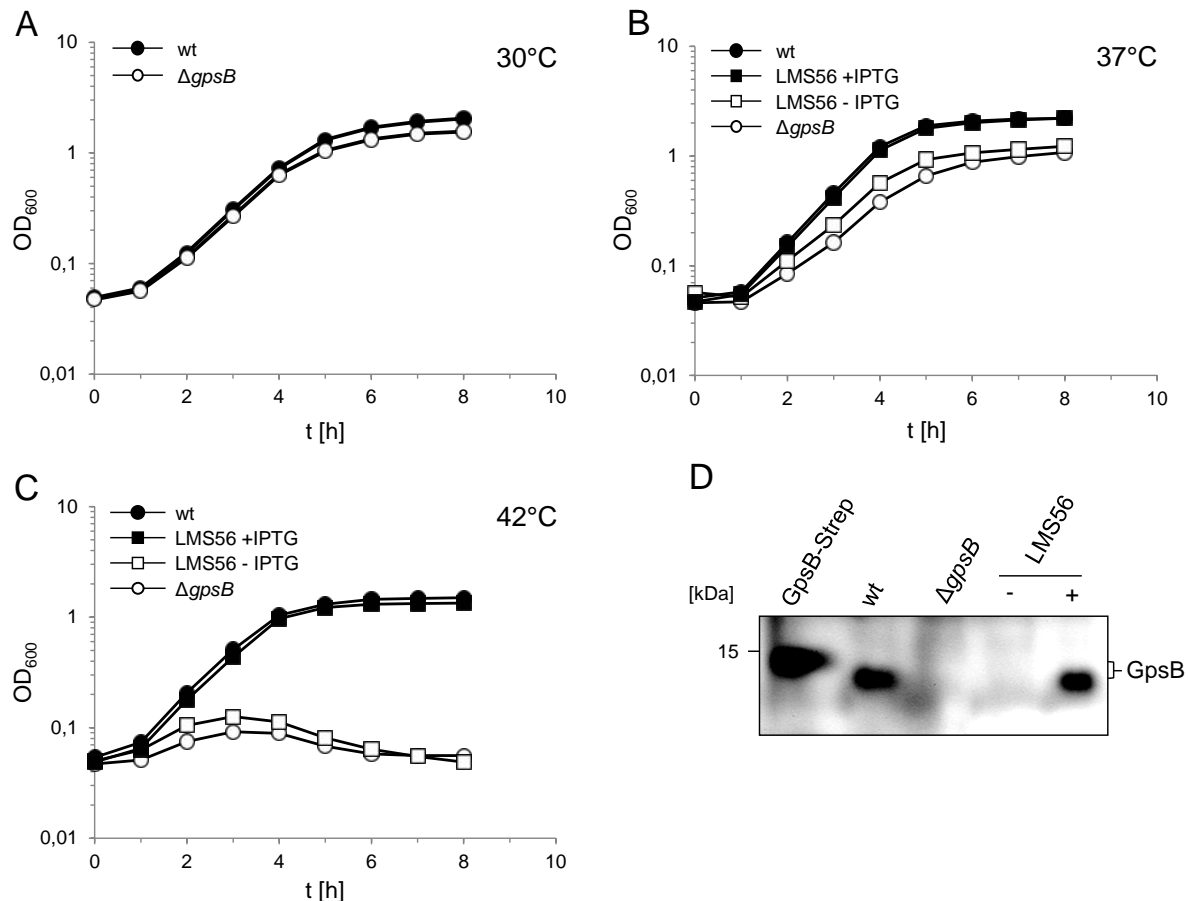


Abb. 7: Wachstumsdefekte von *L. monocytogenes* *gpsB*-Mutanten

(A-C) Wachstumsdefekte der *L. monocytogenes* $\Delta gpsB$ -Mutante und einer IPTG-induzierbaren *gpsB*-Mutante. Die Stämme EGD-e (wt), LMJR19 ($\Delta gpsB$) und LMS56 (IPTG-abhängige *gpsB*-Expression) wurden in BHI-Medium \pm 1 mM IPTG bei 30°C (A), 37°C (B) oder 42°C (C) angezogen und die optische Dichte ($\lambda=600$ nm) stündlich bestimmt. (D) Westernblot zum Nachweis der Abwesenheit von GpsB in den *gpsB*-Mutanten. Die Stämme EGD-e (wt), LMJR19 ($\Delta gpsB$) und LMS56 wurden in BHI-Medium \pm 1 mM IPTG kultiviert, zelluläre Proteinextrakte isoliert und im Westernblot unter Verwendung eines GpsB-spezifischen polyklonalen Antikörpers analysiert. GpsB-Strep wurde hierbei als Kontrolle mitgeführt. Dabei ist zu beachten, dass das Fusionsprotein aufgrund des Strep-tags ein Molekulargewicht von 14 kDa und das ungetaggte GpsB-Protein eins von 11 kDa hat.

3.2.2. Die Deletion von *gpsB* beeinflusst die Autolyse und die Penicillinresistenz

Bei Betrachtung der $\Delta gpsB$ -Mutante im Lichtmikroskop waren Zellen zu erkennen, die durchsichtig erscheinen, da sie vermutlich lysiert sind (Pfeile, Abb. 8A). Der Wildtypstamm EGD-e wies hingegen keine lysierten Zellen auf. In den Rasterelektronenmikroskopie-Aufnahmen, die durch Dr. Michael Laue und Gudrun Holland (ZBS4, RKI Berlin) erstellt wurden, wird zudem deutlich, dass die Zelllänge bei der $\Delta gpsB$ -Mutante inhomogen ist und Zellen vorhanden sind, die länger sind als Wildtyp-Zellen (Abb. 8B), was auf einen Zellteilungsdefekt in der $\Delta gpsB$ -Mutante hinweist.

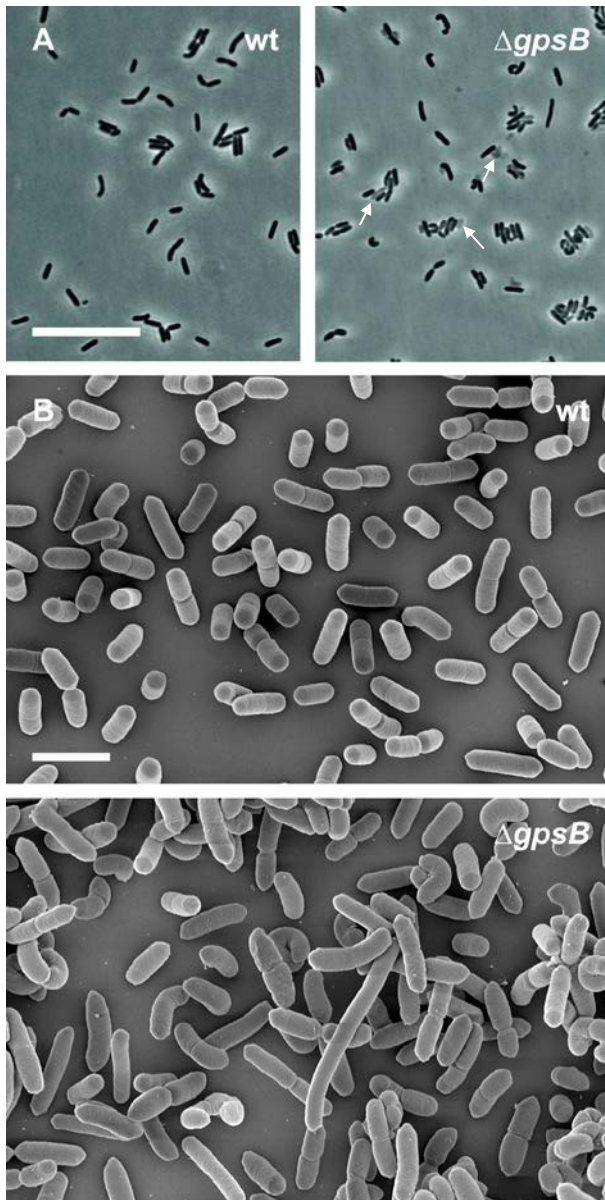


Abb. 8: Morphologische Charakterisierung der *L. monocytogenes* $\Delta gpsB$ -Mutante

(A) Phasenkontrastaufnahmen der *L. monocytogenes*-Stämme EGD-e (wt) und LMJR19 ($\Delta gpsB$). Die Stämme wurden dazu in BHI-Medium bei 37°C bis zur mittleren logarithmischen Wachstumsphase inkubiert und anschließend mikroskopiert. Der Maßstabsbalken entspricht 5 μ m. (B) Rasterelektronenmikroskopie-Aufnahmen der in (A) beschriebenen Stämme, die bei den gleichen Bedingungen kultiviert wurden. Der Maßstabsbalken entspricht 2 μ m. Die Aufnahmen wurden bereitgestellt von Dr. Michael Laue und Gudrun Holland (Rismondo *et al.*, 2015a).

Da eine erhöhte Autolyse eine Schwächung der Zellwand vermuten lässt, wurde die Penicillinresistenz der *gpsB*-Mutanten mit Hilfe von E-Tests bestimmt. Hierbei wurde deutlich, dass sowohl der Stamm LMJR19 ($\Delta gpsB$) als auch Stamm LMS56 ($\Delta gpsB$) in Abwesenheit von IPTG eine ca. 4-fach verringerte Penicillinresistenz aufweisen (Abb. 9A). Um zwischen einer bakteriolytischen und einer lediglich bakteriostatischen Penicillin-Wirkung unterscheiden zu können, wurde ein Autolyse-Assay in Flüssigmedium durchgeführt. Dabei wird die Abnahme der optischen Dichte nach Zugabe von Penicillin bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass beide Stämme nach Wachstum in BHI-Medium ohne IPTG auch in Flüssigmedium eine geringere Resistenz gegen Penicillin aufweisen und es daher zu einer schnelleren Abnahme der optischen Dichte aufgrund von Lyse kommt (Abb. 9B). Um den Einfluss des Penicillins und den Beitrag spontaner Autolyse zu diesem Effekt

voneinander abzugrenzen, wurde ein Autolyse-Assay mit und ohne Zugabe von Penicillin durchgeführt. Die Lyse der $\Delta gpsB$ -Zellen konnte durch Zugabe von Penicillin im Vergleich zur Abwesenheit von Penicillin um das Zweifache gesteigert werden (Abb. 9C). Das zeigt, dass Penicillin auf Zellen der $\Delta gpsB$ -Mutante im Gegensatz zu Wildtyp-Zellen bakteriolytisch wirkt. Diese reduzierte Penicillinresistenz lässt zudem auf eine mögliche Beeinträchtigung der Peptidoglykanbiosynthese schließen.

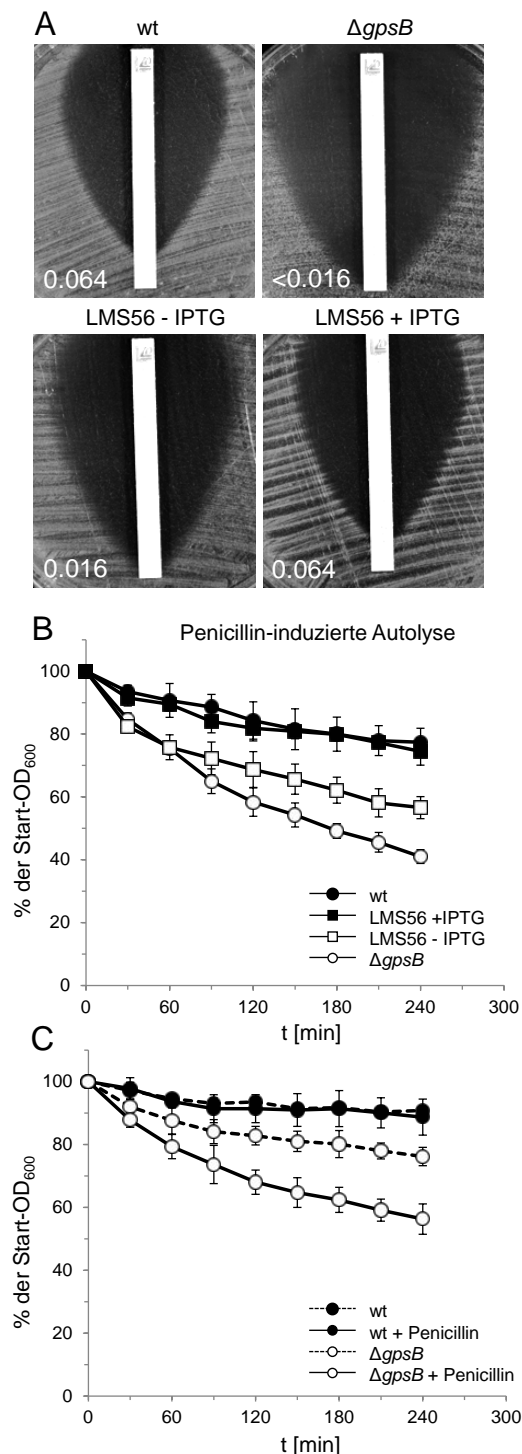


Abb. 9: Die Deletion von *gpsB* beeinflusst die Penicillinresistenz

(A) Penicillin-Sensitivität der *L. monocytogenes gpsB*-Mutanten. Zur Bestimmung der Penicillinresistenz wurden die Stämme EGD-e (wt), LMJR19 ($\Delta gpsB$) und LMS56 (*IgpsB*) auf BHI-Agarplatten ausgestrichen und ein Penicillin G MIC-Teststreifen (0,016-256 μ g/ml, Bestbiondx, Deutschland) auf die Agar-Oberfläche gelegt. Nach einer 24-stündigen Bebrütung bei 37°C konnte die Penicillinresistenz anhand des entstandenen Hemmhofes abgelesen werden. Die Minimale Hemmkonzentration (MHK) ist jeweils angegeben. (B-C) Autolyse-Assays der *L. monocytogenes gpsB*-Mutanten. Die Stämme aus (A) wurden in BHI-Medium \pm IPTG bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ \approx 0,8 angezogen. Nach Zentrifugation wurde das entstandene Zellpellet in 50 mM Tris-HCl-Puffer pH8,0 resuspendiert und 25 μ g/ml Penicillin zugegeben. In (C) wurde die Autolyse im Tris-HCl-Puffer ohne Zugabe von Penicillin mit der Inkubation in Gegenwart von Penicillin verglichen. Die Abnahme der optischen Dichte ($\lambda=600$ nm) wurde über die Zeit photometrisch bestimmt. Mittelwerte und Standardabweichung ergeben sich aus den Werten von drei unabhängigen Experimenten.

3.3. High-molecular-weight Penicillin-bindende Proteine (HMW PBPs) von *L. monocytogenes*

Die Peptidoglykanbiosynthese wird durch Penicillin-bindende Proteine realisiert, die für die Transglykosylierung und Transpeptidierung des Peptidoglykans verantwortlich sind. Die HMW PBPs von *L. monocytogenes* sind bislang kaum untersucht. Zur Behandlung der Listeriose kommen meist β -Laktame wie Ampicillin oder Amoxicillin, in einigen Fällen auch in Kombination mit Gentamycin, zum Einsatz (Allerberger und Wagner, 2010). Angriffspunkt dieser Antibiotikaklasse sind Penicillin-bindende Proteine (Nakagawa *et al.*, 1979, Zapun *et al.*, 2008a, Rismondo *et al.*, 2015b). *L. monocytogenes* besitzt 5 HMW PBPs, zwei bi-funktionale mit Transpeptidase- und Transglykosylase-Aktivität und drei mono-funktionale mit Transpeptidase-Aktivität. Der Aufbau der HMW PBPs und die Bezeichnung in *L. monocytogenes* und der *B. subtilis*-Homologe sind in Abb. 10A dargestellt.

3.3.1. Subzelluläre Lokalisierung der HMW PBPs

Zum besseren Verständnis der Rolle der einzelnen HMW PBPs wurde deren subzelluläre Lokalisation bestimmt. Dazu wurde das *gfp*-Gen mit den N-Termini der einzelnen HMW PBPs fusioniert und als ektopische Kopie im Wildtypstamm exprimiert. Die Synthese der GFP-PBP-Fusionsproteine wurde nach Auftrennung von Membranfraktionen im SDS-Gel durch Färbung mit Bocillin-FL, einem Fluorescein-markierten Penicillin (Zhao *et al.*, 1999, Korsak *et al.*, 2010, Kocaoglu *et al.*, 2012), überprüft. Neben den 4 Proteinbanden, die im Wildtypstamm detektiert werden können, konnte jeweils eine weitere Bande in den Extrakten der Stämme LMS38 (*gfp-pbpA2*), LMS44 (*gfp-pbpA1*), LMS45 (*gfp-pbpB2*) und LMS46 (*gfp-pbpB1*) nachgewiesen werden (Abb. A2, *). GFP-PBP A1 weist eine Größe von ca. 120 kDa auf, GFP-PBP A2 eine von ca. 105 kDa, GFP-PBP B1 und GFP-PBP B2 von ca. 110 kDa. Die erhaltenen Molekulargewichte dieser Fusionsproteine entsprechen den berechneten Molekulargewichten von 118 kDa (GFP-PBP A1), 105 kDa (GFP-PBP A2), 107 kDa (GFP-PBP B1) und 109 kDa (GFP-PBP B2). Aufgrund der erfolgreichen Detektion der PBPs mit Bocillin-FL kann von einer korrekten Faltung der GFP-PBP-Fusionsproteine ausgegangen werden. In den Extrakten des Stammes LMS47 (*gfp-pbpB3*) wurde keine zusätzliche Bande detektiert. GFP-PBP B3 konnte somit nicht mit Bocillin-FL markiert werden (Abb. A2). Allerdings konnte die Expression von GFP-PBP B3 in einem Westernblot unter Verwendung eines GFP-spezifischen Antikörpers nachgewiesen werden (Rismondo *et al.*, 2015b). Die Detektion von PBP B3 in PBP-Fluoreszenzgelen unter Verwendung von Bocillin-FL war unter den verwendeten Bedingungen bislang nie möglich. Korsak *et al.*

zeigten 2010, dass PBP B3 mit einer geringen Affinität von Bocillin-FL gebunden werden kann. Dazu wurden allerdings 50 μ M Bocillin-FL eingesetzt (Korsak *et al.*, 2010). In dieser Arbeit konnte jedoch auch mit höheren Bocillin-FL-Konzentration oder durch die zusätzliche, ektopische Expression von PBP B3 das Protein nicht mit Bocillin-FL nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Daher ist anzunehmen, dass GFP-PBP B3 bzw. PBP B3 unter den getesteten Bedingungen nicht mit Bocillin-FL angefärbt werden können oder nicht bis zur notwendigen Detektionsgrenze akkumulieren.

Mikroskopische Fluoreszenzaufnahmen zeigten, dass GFP-PBP A1 (Abb. 10B), GFP-PBP A2 (Abb. 10C) und GFP-PBP B1 (Abb. 10D) hauptsächlich an der Zellperipherie und am Septum lokalisieren, jedoch nicht in allen Zellen der Population. Die Fluoreszenzsignale von GFP-PBP B2 sind hingegen nur am Septum zu finden (Abb. 10E). Im Gegensatz dazu ist GFP-PBP B3 nur an der Zellperipherie lokalisiert (Abb. 10F). Die unterschiedliche Lokalisation könnte einen Hinweis auf verschiedene Funktionen der einzelnen PBPs liefern. PBP B2 ist vermutlich ein zellteilungsspezifisches Penicillin-bindendes Protein, wohingegen PBP B3 vermutlich nur während des Zellwachstums eine Rolle spielt. PBP A1, PBP A2 und PBP B1 lokalisieren sowohl am Septum als auch an der lateralen Zellwand und weisen somit eine ähnliche Lokalisation auf. Sie könnten daher überlappende Funktionen besitzen.

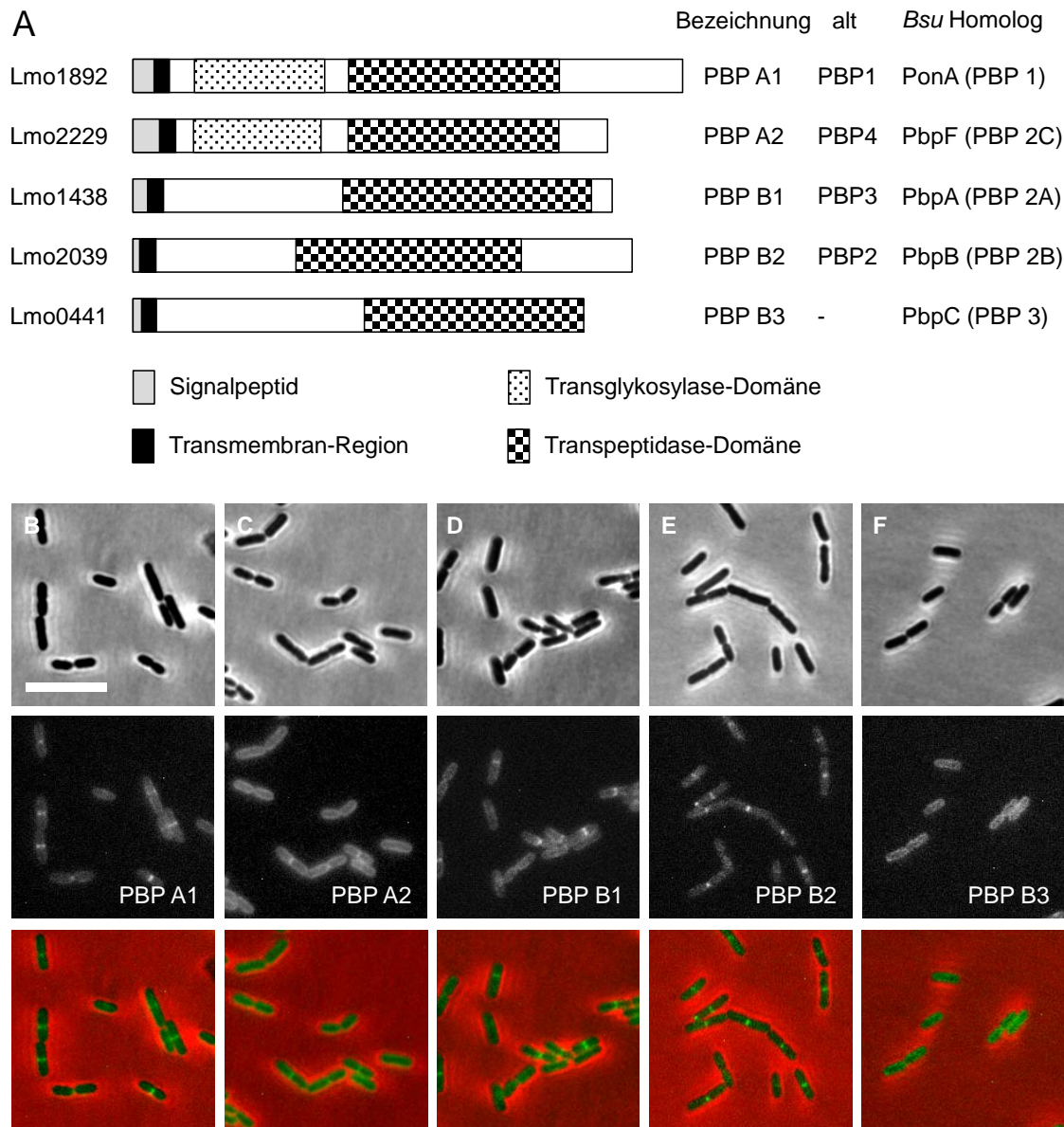


Abb. 10: High-molecular-weight Penicillin-bindende Proteine (HMW PBPs) von *L. monocytogenes* und deren subzelluläre Lokalisation

(A) High-molecular-weight Penicillin-bindende Proteine von *L. monocytogenes*. Schematische Darstellung der Domänenstruktur der fünf HMW PBPs von *L. monocytogenes*. Die Zuordnung der PBP-Bezeichnungen erfolgte gemäß der von anderen Autoren bereits vorgeschlagenen Nomenklatur (Bierne und Cossart, 2007, Korsak *et al.*, 2010). Die alten Bezeichnungen der PBPs wurden entsprechend des Molekulargewichts der einzelnen PBPs im SDS-PAGE-Gel, das mit radioaktiv markiertem Penicillin gefärbt wurde, vergeben (Vicente *et al.*, 1990). Die entsprechenden *B. subtilis*-Homologe (*Bsu*) sind auf der rechten Seite angegeben. (B-F) Subzelluläre Lokalisation der GFP-PBP-Fusionen. Die Stämme LMS38 (*gfp-pbpA2*), LMS44 (*gfp-pbpA1*), LMS45 (*gfp-pbpB2*), LMS46 (*gfp-pbpB1*) und LMS47 (*gfp-pbpB3*) wurden bis zur mittleren logarithmischen Wachstumsphase in BHI-Medium bei 30°C angezogen und die Lokalisation der GFP-Fusionsproteine mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Dazu wurden Aufnahmen im Phasenkontrast- (oben) und im Fluoreszenzmodus (FITC-Filter, Mitte) aufgenommen und unter Verwendung des Programmes NIS-Elements AR (Nikon) übereinandergelagert (unten).

3.3.2. Deletion der *L. monocytogenes pbp*-Gene

Untersuchungen von Gendisruptions-Mutanten ergaben, dass PBP B2 essenziell sein könnte und die anderen Penicillin-bindenden Proteine vermutlich überlappende Funktionen aufweisen (Guinane *et al.*, 2006). Zur genaueren Analyse der Funktion der 5 HMW PBPs wurden im Rahmen dieser Arbeit Marker-freie Deletionsmutanten hergestellt und unter Verwendung verschiedener Methoden charakterisiert. Für die Deletion der *pbp*-Gene wurden Derivate des pMAD-Plasmides verwendet. In den Stämmen LMS57 ($\Delta pbpA1$) und LMS64 ($\Delta pbpA2$) wurden die Transglykosylase- und Transpeptidase-Domänen deletiert und durch ein vorzeitiges Stopp-Codon ersetzt. Für die Herstellung einer $\Delta pbpB3$ -Deletionsmutante (LMJR41) wurde ein pMAD-Derivat konstruiert, das den Austausch einer internen codierenden Region des *pbpB3*-Gens gegen ein Stopp-Codon zur Folge hat. Im Gegensatz dazu sollte der gesamte codierende Bereich der Gene *pbpB1* und *pbpB2* deletiert werden. Die Herstellung dieser beiden Deletionsmutanten war jedoch nicht möglich, was eine Essentialität der beiden Gene vermuten lässt. Die Deletion von *pbpB1* und *pbpB2* war jedoch in den Stämmen LMJR20 und LMJR5 möglich, die eine IPTG-induzierbare, ektopische Kopie der Gene *pbpB1* bzw. *pbpB2* enthielten.

3.3.3. Überprüfung der *L. monocytogenes pbp*-Mutanten

Korsak *et al.* detektierten die 5 HMW PBPs von *L. monocytogenes* durch die Markierung mit Bocillin-FL und die Zuordnung der einzelnen Proteinbanden zu dem jeweiligen Penicillin-bindenden Protein erfolgte über das berechnete Molekulargewicht (Korsak *et al.*, 2010). Die Konstruktion von Deletionsmutanten und die Analyse der Proteinextrakte dieser Stämme ermöglicht die Überprüfung dieser Zuordnung. Gleichzeitig kann dadurch die Abwesenheit der einzelnen PBPs in den Deletionsmutanten LMS57 ($\Delta pbpA1$), LMS64 ($\Delta pbpA2$) und LMJR41 ($\Delta pbpB3$) sowie die IPTG-abhängige Expression der PBPs in den Depletionsstämmen LMJR18 (*IpbpB2*) und LMJR27 (*IpbpB1*) überprüft werden. Dazu wurden Membranfraktionen der *pbp*-Mutanten isoliert und die Penicillin-bindenden Proteine mit Bocillin-FL markiert (Abb. 11). Die Extrakte des Wildtypstammes EGD-e wiesen nach Bocillin-FL-Färbung vier zusätzliche Banden auf. Die oberste Bande, die in Extrakten von LMS57 ($\Delta pbpA1$) abwesend ist, hat eine Größe von ca. 100 kDa und entspricht somit PBP A1 (Abb. 11). In den Extrakten der Stämme LMJR18 (*IpbpB2*) und LMJR27 (*IpbpB1*), die unter Depletionsbedingungen angezogen wurden, fehlt jeweils eine der beiden darauffolgenden Banden mit einer Größe von ca. 80 kDa. Diese zwei dicht beieinander liegenden Banden entsprechen daher PBP B2 (oben) und PBP B1 (unten). Die Proteinbande mit einer Größe von

ca. 70 kDa konnte in den Extrakten von LMS64 ($\Delta pbpA2$) nicht detektiert werden. Hierbei handelt es sich, wie bereits in der Literatur beschrieben um PBP A2 (Zawadzka-Skomial *et al.*, 2006, Van de Velde *et al.*, 2009). Die ermittelten Molekulargewichte der einzelnen HMW PBPs stimmen mit den berechneten Molekulargewichten, die in Abb. 11 angegeben sind, überein. Das Fluoreszenzmuster des Stammes LMJR41 ($\Delta pbpB3$) unterscheidet sich nicht vom Fluoreszenzmuster des Wildtypstammes (Abb. 11). Dahingegen konnten Van de Velde *et al.* einen Unterschied zwischen den Fluoreszenzmustern vom Wildtypstamm und einer $\Delta pbpB3$ -Mutante sehen. In Extrakten der $\Delta pbpB3$ -Mutante fehlte eine Bande bei ca. 75 kDa (Van de Velde *et al.*, 2009). Die Expression von *pbpB3* lag hier somit entweder unterhalb der Detektionsgrenze oder wird unter den in dieser Arbeit eingesetzten Bedingungen nicht von Bocillin-FL gebunden.

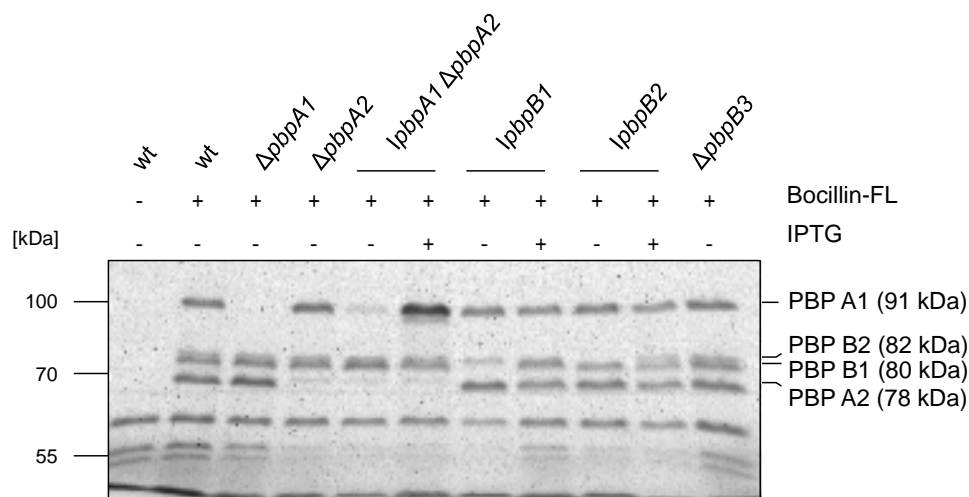


Abb. 11: Detektion der Penicillin-bindenden Proteine von *L. monocytogenes*

Zur Detektion und Zuordnung der Proteinbanden wurden der Wildtypstamm EGD-e (wt) und die *pbp*-Mutanten LMS57 ($\Delta pbpA1$), LMS64 ($\Delta pbpA2$), LMJR30 (*IpbpA1* $\Delta pbpA2$), LMJR27 (*IpbpB1*), LMJR18 (*IpbpB2*) und LMJR41 ($\Delta pbpB3$) in BHI-Medium \pm 1 mM IPTG bei 37°C bis zu einer optischen Dichte ($\lambda=600$ nm) von 1 kultiviert und Membranfraktionen isoliert. 20 μ g der Membranfraktionen wurden mit Bocillin-FL inkubiert und anschließend in einer 8 %-igen SDS-PAGE aufgetrennt. PBPs, die mit dem Fluorescein markiert wurden, konnten mit dem Fuji raytest FLA 2000 Fluoreszenzscanner detektiert werden. Eine unmarkierte Probe von EGD-e wurde zum Ausschluss unspezifischer Signale mitgeführt.

3.3.4. Wachstum der *pbp*-Mutanten

Die Anwesenheit von zwei Klasse A und drei Klasse B HMW PBPs in *L. monocytogenes* lässt vermuten, dass einige PBPs überlappende Funktionen aufweisen. Daher sollte der Einfluss der Deletion bzw. Depletion der einzelnen PBPs auf das Wachstum überprüft werden. Die Deletion der bi-funktionalen Penicillin-bindenden Proteine *pbpA1* (LMS57) und *pbpA2* (LMS64) hatte keinen Einfluss auf das Wachstum in BHI-Medium bei 37°C (Abb. 12A), führte jedoch zu einem leichten Wachstumsdefekt bei 42°C (Abb. A3A). Um den Einfluss der Depletion von PBP B1 (LMJR27) und PBP B2 (LMJR18) untersuchen zu

können, wurden Vorkulturen beider Stämme in BHI-Medium mit IPTG kultiviert, anschließend mit frischem BHI-Medium gewaschen und für die Wachstumsexperimente in An- und Abwesenheit von IPTG eingesetzt. Dabei zeigte sich, dass die Depletion von PBP B1 im Stamm LMJR27 zu einem drastischen Wachstumsdefekt bei 37°C führte (Abb. 12B). Bei erhöhter Temperatur (42°C) war die Depletion von PBP B1 sogar letal (Abb. A3B). Bei 37°C führte die Depletion von PBP B2 in Stamm LMJR18 hingegen zu keinem Wachstumsunterschied unter diesen Bedingungen (Abb. A4A). Allerdings stoppte das Wachstum dieses Stammes nach 4 h bei 42°C, vermutlich aufgrund der einsetzenden Depletion von PBP B2 und der damit einhergehenden Lyse der Zellen, welche durch die Abnahme der optischen Dichte erkennbar ist (Abb. A4B). Für die vollständige PBP B2-Depletion in Stamm LMJR18 wurde die Depletionskultur für 24 h bei 37°C ohne IPTG kultiviert. Diese Kultur diente dann als Ausgangspunkt für die folgenden Wachstumskurven. Wie erwartet, verhinderte die vollständige Depletion von PBP B2 das Wachstum der Zellen unter Standardbedingungen (37°C), wohingegen die Anwesenheit von IPTG das Wachstum der so vorbehandelten Zellen immer noch erlaubt (Abb. 12C). Im Gegensatz dazu führte die Deletion von *pbpB3* (LMJR41) zu keinem Wachstumsdefekt bei 37°C (Abb. 12D) und 42°C (Abb. A3C).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass PBP A1 und PBP A2 überlappende Funktionen haben und eine Deletion durch das jeweilig andere Penicillin-bindende Protein kompensiert werden kann. Dahingegen kann die Funktion von PBP B1 und PBP B2 nicht von anderen PBPs übernommen werden, wodurch die Depletion dieser PBPs das Wachstum verhindert. PBP B3 scheint entweder unter den getesteten Bedingungen nicht enzymatisch aktiv zu sein oder seine Funktion kann von den anderen PBPs ausgeübt werden.

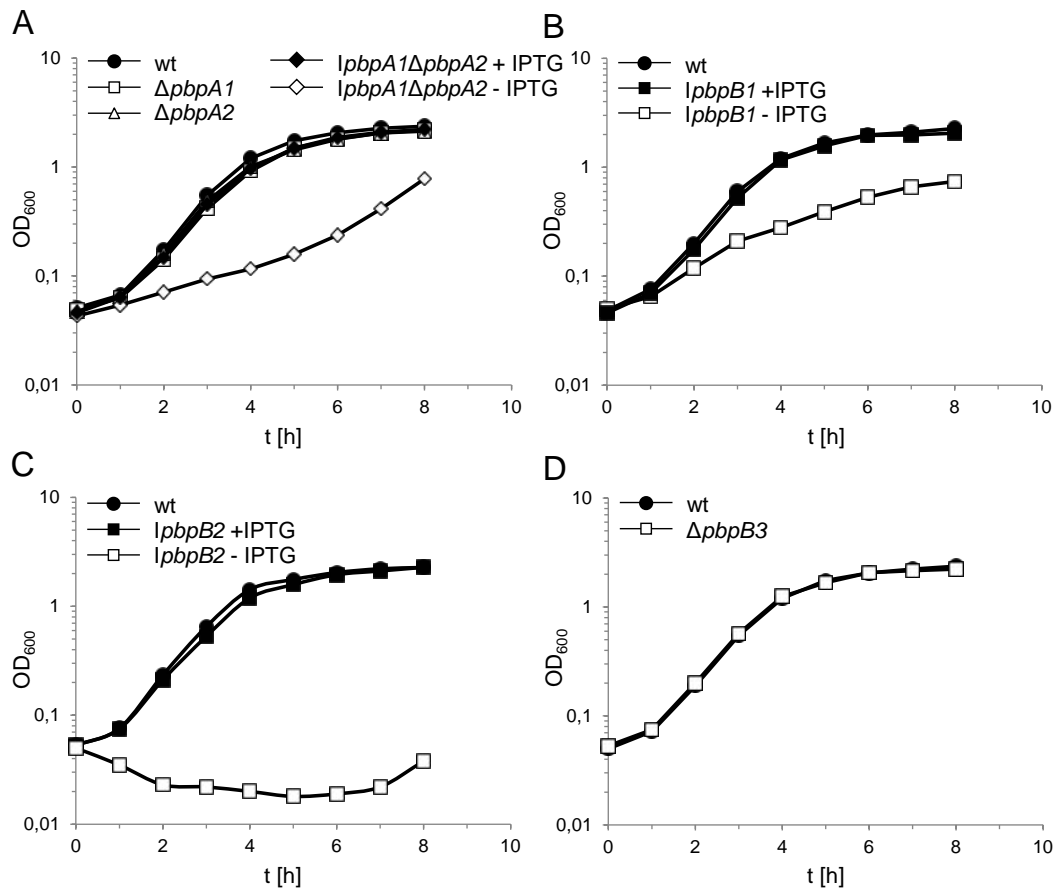


Abb. 12: Wachstum der *L. monocytogenes* *pbp*-Mutanten

(A) Einfluss der Deletion der Klasse A HMW PBPs *pbpA1* und *pbpA2* auf das Wachstum. Die Stämme EGD-e (wt), LMS57 ($\Delta pbpA1$), LMS64 ($\Delta pbpA2$) und LMJR30 (*lpbpA1* $\Delta pbpA2$) wurden in BHI-Medium \pm 1 mM IPTG bei 37°C angezogen und die optische Dichte ($\lambda=600$ nm) stündlich bestimmt. (B-D) Einfluss der Deletion bzw. Depletion der Klasse B HMW PBPs PBP B1, PBP B2 und PBP B3 auf das Wachstum. Dazu wurden die Stämme EGD-e (wt), LMJR27 (*lpbpB1*), LMJR18 (*lpbpB2*) und LMJR41 ($\Delta pbpB3$) in BHI-Medium \pm 1 mM IPTG bei 37°C kultiviert und die OD₆₀₀ jede Stunde gemessen. Zur vollständigen Depletion von PBP B2 wurde eine Vorkultur mit IPTG kultiviert, gewaschen und zur Beimpfung von frischem BHI-Medium ohne IPTG verwendet. Diese wurde 24 h bei 37°C inkubiert und anschließend für die Wachstumskurve (C) eingesetzt. Es ist jeweils eine repräsentative Wachstumskurve dargestellt.

3.3.5. Die Abwesenheit der beiden bi-funktionalen PBPs ist letal

Um zu überprüfen, ob PBP A1 und PBP A2 überlappende Funktionen haben, sollte eine PBP A1/A2-Doppelmutante hergestellt werden. Mehrere Versuche diese Mutante herzustellen, scheiterten. Daher wurde eine PBP A1/A2-Mutante hergestellt, die eine ektoptische IPTG-induzierbare Kopie von *pbpA1* besitzt (LMJR30 – *lpbpA1* $\Delta pbpA2$). Zur Untersuchung des Wachstums von LMJR30 wurde eine Vorkultur mit IPTG kultiviert, gewaschen und zur Beimpfung frischen BHI-Mediums verwendet. Hierbei zeigte sich ein deutlicher Wachstumsdefekt bei 37°C und 42°C (Abb. 12A und A3A). Bei der Detektion der Penicillin-bindenden Proteine in Proteinextrakten des Stammes LMJR30 wird ersichtlich, dass eine geringfügige Hintergrundexpression von *pbpA1* auch in Abwesenheit von IPTG zu verzeichnen ist (Abb. 11). Dadurch kann erklärt werden, dass Stamm LMJR30 in Medium

ohne IPTG trotz Abwesenheit beider Klasse A PBPs wachsen kann. Die gleichzeitige Deletion von *pbpA1* und *pbpA2* in *L. monocytogenes* war jedoch nicht tolerierbar.

3.3.6. Zellmorphologie der *pbp*-Mutanten

Zur Charakterisierung der Zellmorphologie wurden die *pbp*-Mutanten mit Hilfe von Transmissionselektronenmikroskopie (TEM, Abb. 13A, C, E, G und Abb. 14A, C, E) und Rasterelektronenmikroskopie (REM, Abb. 13B, D, F, H und Abb. 14B, D, F) betrachtet. Die Aufnahmen wurden von den Kooperationspartnern Lars Möller, Petra Kaiser und Gudrun Holland (ZBS4, RKI Berlin) angefertigt. Die Abwesenheit einzelner Penicillin-bindender Proteine, die für die Peptidoglykanbiosynthese verantwortlich sind, könnte zu einer Veränderung der Zellwand führen, die möglicherweise mittels TEM aufgelöst werden kann. Keiner der untersuchten Stämme wies hierbei eine signifikante Veränderung in Dicke oder Struktur des Peptidoglykans auf (Abb. 13A, C, E, G und Abb. 14A, C, E). Auffällig ist jedoch, dass die Depletion von PBP B2 (LMJR18) dazu führte, dass keine Septen mehr gebildet werden konnten. Die leichte Invagination an der Position, wo ein Septum zu erwarten wäre, könnte darauf hinweisen, dass es noch zur initialen Konstriktion des FtsZ-Ringes kommt, dessen weitere Einschnürung sich jedoch nicht fortsetzt (Abb. 14C). In den REM-Aufnahmen wird deutlich, dass die Deletion von *pbpA2* (LMS64) und *pbpB3* (LMS41) keine morphologischen Veränderungen zur Folge hat (Abb. 13F und Abb. 14F). Die Deletion von *pbpA1* (LMS57) resultiert in leicht verlängerten, gebogenen Zellen (Abb. 13D). Bei Depletion von PBP A1 im $\Delta pbpA2$ -Hintergrund (LMJR30) kann ebenfalls eine Zellverlängerung beobachtet werden (Abb. 13H). Dahingegen führte die Depletion von PBP B1 (LMJR27) zu einer fast kokkoiden Zellform (Abb. 14B). Wie bereits beschrieben, führte die Depletion von PBP B2 (LMJR18) zu einer verringerten Septenbildung, was sich in einer drastischen Verlängerung der Zellen manifestiert (Abb. 14D). Der Einfluss von PBP B2 auf die Septenbildung deckt sich mit der septalen Lokalisation von GFP-PBP B2 und bekräftigt die Vermutung, dass PBP B2 ein zellteilungsspezifisches Penicillin-bindendes Protein ist.

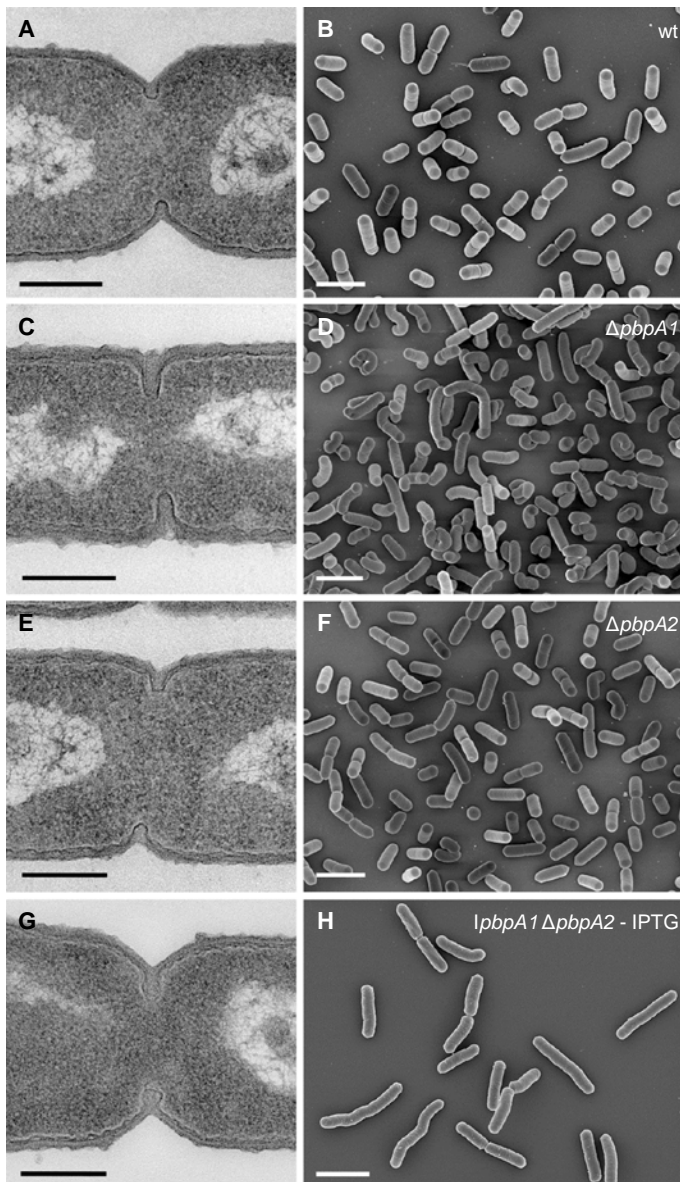


Abb. 13: Einfluss der Deletion von *pbpA1* und *pbpA2* auf die Zellmorphologie

Transmissions- (A, C, E, G) und Raster-elektronenmikroskopie-Aufnahmen (B, D, F, H) von fixierten Zellen der *L. monocytogenes* $\Delta pbpA1$ - und $\Delta pbpA2$ -Mutanten. Die Stämme EGD-e (wt), LMS57 ($\Delta pbpA1$), LMS64 ($\Delta pbpA2$) und LMJR30 (*lbpA1* $\Delta pbpA2$) wurden in BHI-Medium bis zur mittleren logarithmischen Wachstumsphase kultiviert und einer chemischen Fixierung und anschließender Elektronenmikroskopie unterzogen (Rismondo *et al.*, 2015b). Die Maßstabsbalken entsprechen 200 nm (linke Spalte) bzw. 2 μ m (rechte Spalte). Die Aufnahmen wurden von Lars Möller, Gudrun Holland und Petra Kaiser zur Verfügung gestellt.

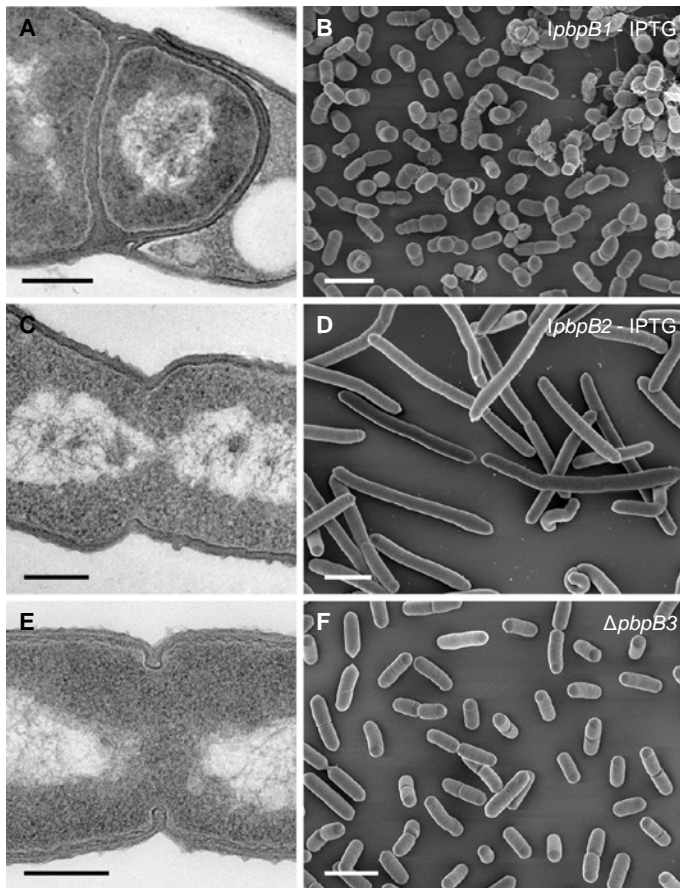


Abb. 14: Einfluss der Deletion von *pbpB3* und der Depletion von PBP B1 und PBP B2 auf die Zellmorphologie

Transmissions- (A, C, E) und Rasterelektronenmikroskopie-Aufnahmen (B, D, F) von fixierten Zellen der *L. monocytogenes* Stämme, bei denen Klasse B HMW PBPs deletiert oder depletiert sind. Die Stämme EGD-e (wt), LMJR27 (*IpbpB1*), LMJR18 (*IpbpB2*) und LMJR41 ($\Delta pbpB3$) wurden in BHI-Medium bis zur mittleren logarithmischen Wachstumsphase kultiviert und einer chemischen Fixierung und anschließender Elektronenmikroskopie unterzogen (Rismondo *et al.*, 2015b). Die Maßstabsbalken entsprechen 200 nm (linke Spalte) bzw. 2 μ m (rechte Spalte). Die Aufnahmen wurden von Lars Möller, Gudrun Holland und Petra Kaiser zur Verfügung gestellt.

Zur Quantifizierung der Zelllängenunterschiede der *pbp*-Mutanten wurde die Zellmembran der Stämme mit Nilrot angefärbt und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert (Abb. 15A). Anschließend wurde die Länge von 600 Zellen pro Stamm gemessen und die relative Häufigkeit gegen die Zelllänge in μ m geplottet (Abb. 15B-C). Wie bereits in den REM-Aufnahmen ersichtlich, führte die Deletion von *pbpA1* im Stamm LMS57 zu einer erhöhten Zelllänge ($1,44 \pm 0,2 \mu$ m) im Vergleich zum Wildtypstamm ($1,16 \pm 0,2 \mu$ m). Die Depletion von PBP B1 im Stamm LMJR27 resultierte in einer reduzierten Zelllänge ($0,88 \pm 0,2 \mu$ m, Abb. 15B), wohingegen die Depletion von PBP B2 im Stamm LMJR18 zu einer deutlichen Verlängerung der Zellen führte ($10,9 \pm 5 \mu$ m, Abb. 15C). Im Gegensatz dazu haben die Deletion von *pbpA2* (LMS64, $1,26 \pm 0,2 \mu$ m) und *pbpB3* (LMJR41, $1,18 \pm 0,3 \mu$ m) keinen signifikanten Einfluss auf die Zelllänge (Abb. 15B). Zusammengefasst lässt sich sagen, dass PBP A1 eine wichtige Rolle in der Zellteilung und der Erhaltung der Zellform spielt. PBP B1 ist an der Zellperipherie lokalisiert und übernimmt Aufgaben in der lateralen Zellwandsynthese, wohingegen PBP B2 für die Bildung der Septen verantwortlich ist.

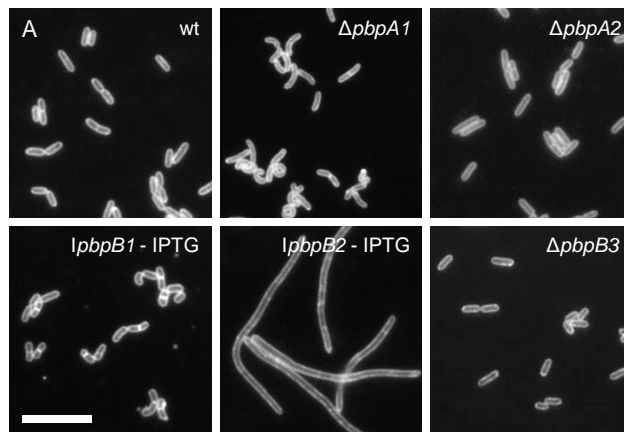
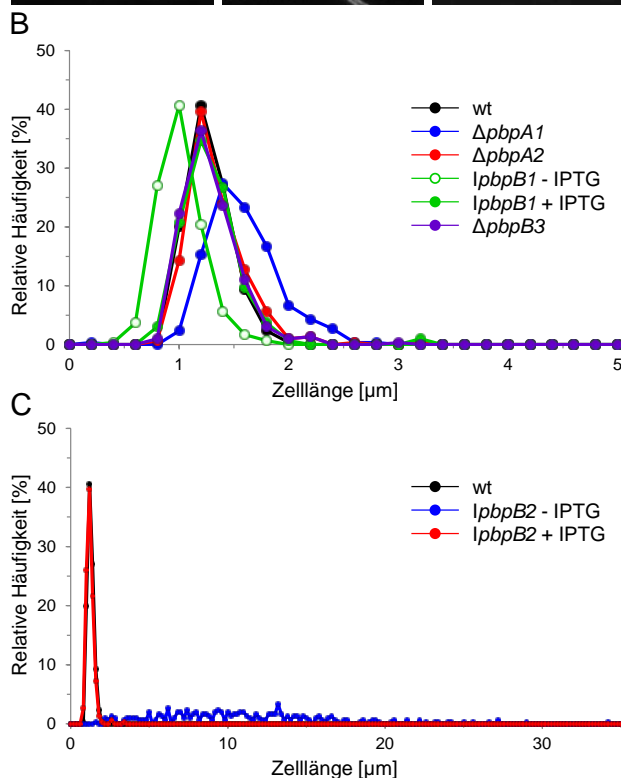


Abb. 15: Die verschiedenen Zellteilungsphänotypen der *L. monocytogenes* *pbp*-Mutanten

(A) Fluoreszenzaufnahmen der *pbp*-Mutanten nach Membranfärbung mit Nilrot. Die Stämme EGD-e (wt), LMS57 ($\Delta pbpA1$), LMS64 ($\Delta pbpA2$), LMJR27 (*lpbpB1*), LMJR18 (*lpbpB2*) und LMJR41 ($\Delta pbpB3$) wurden in BHI-Medium \pm 1 mM IPTG bei 37°C bis zur mittleren logarithmischen Wachstumsphase kultiviert. (B-C) Die Zelllänge von 600 Zellen pro Stamm wurde bestimmt und gegen die relative Häufigkeit aufgetragen.



3.3.7. Die Zellwand der *pbp*-Mutanten ist geschwächt

Penicillin-bindende Proteine sind der Angriffspunkt von β -Laktam-Antibiotika (Nakagawa *et al.*, 1979, Sauvage *et al.*, 2008), wodurch eine Untersuchung der Resistenz der hergestellten *pbp*-Mutanten gegenüber dieser Antibiotikaklasse von großem Interesse war. Zu diesem Zweck wurden die minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) für ausgewählte zellwandaktive Antibiotika (Ampicillin, Amoxicillin, Penicillin, Meropenem, Vancomycin) mit Hilfe von E-Tests bestimmt. Das Antibiotikum Gentamycin, welches die Proteinbiosynthese inhibiert, wurde als Kontrolle mitgeführt. Die Sensitivität gegenüber Vancomycin und Gentamycin unterschied sich bei den getesteten *pbp*-Mutanten kaum von den MHK-Werten des Wildtypstammes (Tab. 16). Im Gegensatz dazu führte die Abwesenheit der einzelnen HMW PBPs zu unterschiedlich starken Beeinträchtigungen der Resistenz gegenüber den

verschiedenen β -Laktam-Antibiotika (Tab. 16). Die Deletion von *pbpA1* (LMS57) und *pbpA2* (LMS64) führte zu einem geringen Resistenzverlust gegenüber Ampicillin, Amoxicillin und Meropenem, jedoch zu einer deutlich erhöhten Sensitivität gegenüber Penicillin. Darüber hinaus konnte eine deutlich verringerte Resistenz gegenüber allen getesteten β -Laktam-Antibiotika in Zellen verzeichnet werden, bei denen PBP B1 (LMJR27) depletiert wurde. Die Depletion von PBP B2 (LMJR18) resultierte in einer deutlich erhöhten Sensitivität gegenüber Ampicillin, Amoxicillin und Meropenem, jedoch nur in einer leichten Herabsenkung des MHK-Wertes für Penicillin (Tab. 16). Im Gegensatz dazu resultierte die Deletion von *pbpB3* (LMJR41) in einer 2-3-fach erhöhten Sensitivität gegenüber Penicillin und Ampicillin (Tab. 16). Dieser Befund stellt den ersten Nachweis eines $\Delta pbpB3$ -Phänotyps dar und beweist, dass PBP B3 enzymatisch aktiv ist.

Die Depletion von PBP B1 führte zu den drastischsten Effekten mit einer 3- bis 4-fachen Reduktion der Resistenz gegenüber Ampicillin, Penicillin und Meropenem. Aus den erhaltenen Ergebnissen kann daher geschlussfolgert werden, dass es sich bei PBP B1, wie bereits in früheren Arbeiten vermutet (Gutkind *et al.*, 1990, Pierre *et al.*, 1990, Vicente *et al.*, 1990), um das Hauptangriffsziel der β -Laktam-Antibiotika in *L. monocytogenes* handelt.

β -Laktam-Antibiotika wirken in der Regel bakteriostatisch auf *L. monocytogenes*, d. h. sie verhindern das Wachstum der Bakterien, lysieren sie jedoch nicht (Hof, 2003, Hof, 2004, Allerberger und Wagner, 2010). Die Inaktivierung der HMW PBPs könnte jedoch dazu führen, dass die Antibiotika-Behandlung zur Bakteriolyse führt. Deshalb wurde ein quantitativer Autolyse-Assay in Flüssigmedium durchgeführt, bei dem die Zellen mit Penicillin behandelt wurden. Die Deletion und Depletion der meisten HMW PBPs führte zu keiner bakteriolytischen Wirkung von Penicillin (Abb. 16A). Die Ausnahme bildet der Stamm LMJR27 (*IpbpB1*), bei dem PBP B1 depletiert wurde. Dieser Stamm zeigte eine Reduktion der optischen Dichte nach Zugabe von Penicillin, was mit einer Lyse der Zellen zu erklären ist (Abb. 16A). Dieser Effekt beruht zu $\frac{2}{3}$ auf der endogenen Autolyse des Stammes, kann jedoch durch Zugabe von Penicillin gesteigert werden (Abb. 16B). Demzufolge wird PBP B1 für die Aufrechterhaltung der Zellintegrität und zur Vermittlung der Penicillinresistenz benötigt.

Tab. 16: Minimale Hemmkonzentration verschiedener Antibiotika gegenüber den *L. monocytogenes pbp*-Mutanten

Stamm	Genotyp	Penicillin ¹	Ampicillin ¹	Amoxicillin ¹	Meropenem ¹	Vancomycin ¹	Gentamycin ¹
EGD-e	wt	0,074±0,017	0,053±0,018	0,0183±0,004	0,048±0,016	1,5±0,5	0,25±0,00
LMS57	<i>ΔpbpA1</i>	0,029±0,005	0,053±0,018	0,016±0,00	0,052±0,01	1,33±0,288	0,253±0,109
LMS64	<i>ΔpbpA2</i>	0,029±0,005	0,037±0,008	<0,016	0,034±0,012	1,5±0,05	0,21±0,035
LMJR30 - IPTG	<i>IpbbpA1 ΔpbpA2</i>	0,016±0,00	0,016±0,00	<0,016	0,026±0,005	1,67±0,29	0,25±0,11
LMJR18 - IPTG ²	<i>IpbbpB2</i>	0,053±0,01	0,016±0,00	<0,016	0,023±0,00	1,83±0,29	0,21±0,035
LMJR27 - IPTG	<i>IpbbpB1</i>	<0,016	<0,016	<0,016	0,011±0,004	1,5±0,00	0,31±0,16
LMJR41	<i>ΔpbpB3</i>	0,027±0,009	0,027±0,009	<0,016	0,042±0,009	1,83±0,29	0,27±0,1

Minimale Hemmkonzentrationen sind als Mittelwerte ± Standardabweichungen angegeben, die aus drei unabhängigen Experimenten berechnet wurden.

¹ – Alle Konzentrationen sind in µg/ml angegeben.

² – BHI-Agarplatten wurden zur Depletion von PBP B2 mit 0,025 mM IPTG versetzt.

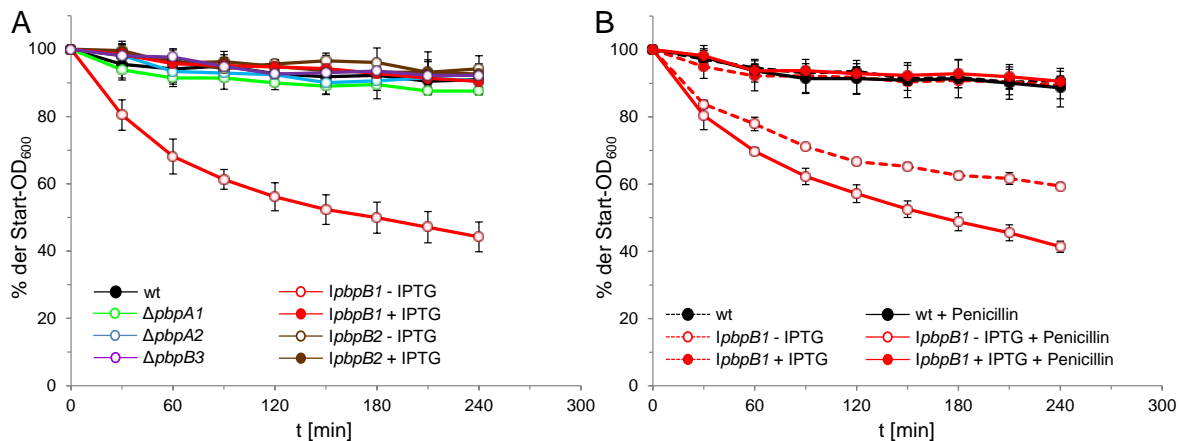


Abb. 16: Einfluss der PBPs auf die Penicillin-induzierte Autolyse

(A) Bestimmung der Penicillin-induzierten Autolyse. Die *L. monocytogenes* Stämme EGD-e (wt), LMS57 ($\Delta pbpA1$), LMS64 ($\Delta pbpA2$), LMJR27 (*lbpB1*), LMJR18 (*lbpB2*) und LMJR41 ($\Delta pbpB3$) wurden in BHI-Medium \pm 1 mM IPTG bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ \approx 0,8 angezogen. Nach dem die Zellen gewaschen und in 50 mM Tris-HCl-Puffer pH8,0 resuspendiert wurden, wurde die Kultur mit 25 μ g/ml Penicillin versetzt und bei 37°C inkubiert. (B) Vergleich der spontanen Autolyse und Penicillin-induzierten Lyse bei PBP B1-Depletion. Die Stämme EGD-e (wt) und LMJR27 (*lbpB1*) wurden wie in (A) beschrieben kultiviert und die Abnahme der optischen Dichte ($\lambda=600$ nm) über die Zeit in Ab- und Anwesenheit von Penicillin photometrisch bestimmt. Mittelwerte und Standardabweichungen ergeben sich aus den Werten von drei unabhängigen Experimenten.

Um zu ermitteln, ob die Deletion bzw. Depletion der einzelnen HMW PBPs zu einer Veränderung in der Peptidoglykan-Zusammensetzung führt, wurde eine Muropeptidanalyse mit den Kooperationspartnern Prof. Dr. Waldemar Vollmer und Christine Aldridge (Newcastle University) durchgeführt (Rismondo *et al.*, 2015a). Unter Verwendung der Muramidase Cellosyl konnten sechs prominente Muropeptide mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) aufgetrennt und quantifiziert werden (Abb. 17A). Durch Massenspektrometrie wurden die erhaltenen Muropeptid-Peaks möglichen Strukturen zugeordnet (Abb. 17B). Das Peptidoglykan von *L. monocytogenes* weist eine amidierter *meso*-Diaminopimelinsäure an Position 3 der Tetrapeptidkette auf und hat einen hohen Anteil an Glucosamin-Resten infolge der Deacetylierung von N-Acetylglucosamin (Vollmer und Tomasz, 2000, Boneca *et al.*, 2007). Die Deletion bzw. Depletion der meisten HMW PBPs führte zu keinen Veränderungen der Peptidoglykan-Zusammensetzung im Vergleich zum Wildtypstamm (Abb. 17C). Zellen, in denen PBP B1 depletiert ist (LMJR27), wiesen einen höheren Anteil an den beiden acetylierten dimeren Muropeptiden Tri(NH₂) und TetraTri(NH₂)₂ auf (um 3% und 6%). Zudem sind die deacetylierten Muropeptide Tri(NH₂)(deAc), TetraTri(NH₂)₂(deAc) II und TetraTri(NH₂)₂(deAc)₂ um jeweils 3% reduziert. Die in Abb. 17C dargestellten Unterschiede in der Muropeptidzusammensetzung konnten in einer zweiten Analyse reproduziert werden (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse weisen auf eine reduzierte Aktivität der Peptidoglykan-Deacetylase im PBP B1-Depletionsstamm LMJR27 hin (Abb. 17). Die Quervernetzung des Peptidoglykans wurde

durch die Abwesenheit lediglich eines der 5 HMW PBPs nicht beeinflusst. Daher scheint die Anwesenheit der jeweils anderen vier PBPs zu genügen, um die normale Quervernetzung sicherzustellen (Abb. 17C).

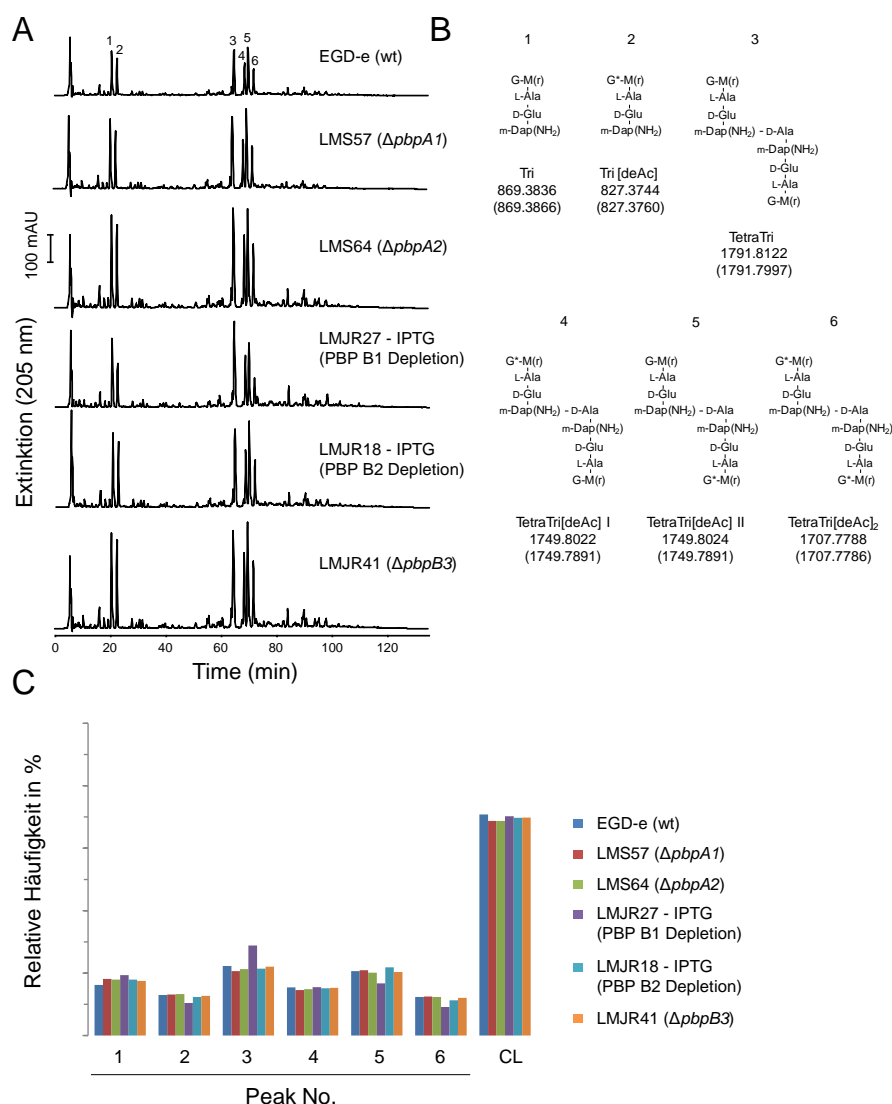


Abb. 17: Peptidoglykan-Zusammensetzung in den *pbp*-Mutanten

(A) Muropeptidprofile der *pbp*-Mutanten, die mittels HPLC ermittelt wurden. Die prominenten Muropeptid-Peaks sind nummeriert. (B) Muropeptidstrukturen, die den prominenten Muropeptid-Peaks aus (A) zuzuordnen sind. Die Namen der Muropeptide und die ermittelten m/z-Werte sind unter den Strukturen angegeben. Der obere Wert entspricht dem ermittelten m/z-Wert, der untere (in Klammern) dem theoretischen m/z-Wert. G, N-Acetylglucosamin; G^{*}, Glucosamin; M, N-Acetylmuraminsäure; m-Dap(NH₂), amidierte meso-Diaminopimelinsäure. TetraTri[deAc] liegt in zwei isomeren Formen vor (I und II), bei denen die Position von G und G^{*} nicht bekannt sind. (C) Relative Häufigkeit der Muropeptide 1-6 und der prozentuale Anteil der Peptide in Cross-Links (CL).

3.3.8. Gesteigerte Lysozymresistenz durch die Deletion von *gpsB* und *pbpB1*

β-Laktam-Antibiotika binden an der Transpeptidase-Domäne der Penicillin-bindenden Proteine, wodurch die Quervernetzung des Peptidoglykans inhibiert wird. Dies führt zu einer Schwächung der bakteriellen Zellwand. Dahingegen spaltet das Enzym Lysozym die β-1→4-glykosidische Bindung zwischen N-Acetylmuraminsäure und N-Acetylglucosamin im

Peptidoglykan (Callewaert und Michiels, 2010). Diese Reaktion resultiert ebenfalls in einer geschwächten Zellwand. Um den Einfluss der Abwesenheit einzelner Penicillin-bindender Proteine auf die Resistenz gegenüber Lysozym zu untersuchen, wurde ein quantitativer Autolyse-Assay durchgeführt, bei dem die Bakterienzellen mit Lysozym inkubiert wurden. Die Depletion von PBP B1 (LMJR27) bewirkte eine deutliche Steigerung der Lysozymresistenz. Nach zweistündiger Lysozymbehandlung waren lediglich 60% der eingesetzten Zellen des Stammes LMJR27 lysiert, wohingegen die optische Dichte ($\lambda=600$ nm) des Wildtypstammes um ca. 98% abgenommen hatte. Die Deletion von *pbpA1* (LMS57) und *pbpA2* (LMS64) führte zu einer geringfügigen Erhöhung der Lysozymresistenz (Abb. 18A). Im Gegensatz dazu hatte die Deletion von *pbpB3* (LMJR41) und die Depletion von PBP B2 (LMJR18) keinen Einfluss auf die Resistenz gegenüber Lysozym.

Da die Deletion von *gpsB* zu einer erhöhten Penicillinsensitivität führte, wie sie in dieser Arbeit auch für PBP B1-depletierte LMJR27-Zellen beschrieben wurde, bestand die Vermutung, dass die Inaktivierung beider Gene zu verwandten Phänotypen führt. Daher wurde auch die Lysozymresistenz der Δ *gpsB*-Mutante (LMJR19) bestimmt. Dieser Stamm zeigte, wie PBP B1-depletierte LMJR27-Zellen, ebenfalls eine gesteigerte Lysozymresistenz (Abb. 18A).

Da Lysozym ein Bestandteil der Wirtsabwehr gegen Bakterien ist, wurden von Bakterien verschiedene Resistenzmechanismen zur Abwehr von Lysozym entwickelt. Beispielsweise führt die O-Acetylierung des Peptidoglykans zu einer verringerten Wirkung des Lysozyms und weiterer Muramidasen (Brumfitt *et al.*, 1958, Vollmer, 2008). Möglicherweise ist der O-Acetylierungsgrad durch die Deletion von *gpsB* bzw. die Depletion von PBP B1 verändert, wodurch die Stämme LMJR19 und LMJR27 resistenter gegenüber Lysozym werden.

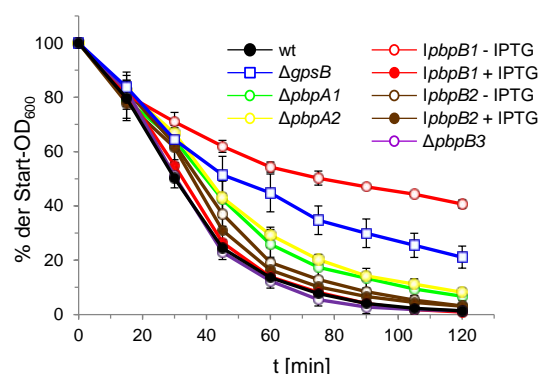


Abb. 18: Die Deletion von *gpsB* und die Depletion von PBP B1 führt zu einer erhöhten Lysozymresistenz
Autolyse-Assays von *L. monocytogenes* *pbp*- und *gpsB*-Mutanten. Die Stämme EGD-e (wt), LMS57 (Δ *pbpA1*), LMS64 (Δ *pbpA2*), LMJR18 (*lpbpB2*), LMJR27 (*lpbpB2*), LMJR41 (Δ *pbpB3*) und LMJR19 (Δ *gpsB*) wurden in BHI-Medium bei 37°C bis zu einer $OD_{600} \approx 0,8$ angezogen. Nach Zentrifugation wurde das entstandene Zellpellet in 50 mM Tris-HCl-Puffer pH8,0 resuspendiert und 2,5 μ g/ml Lysozym zugegeben. Die Abnahme der optischen Dichte ($\lambda=600$ nm) wurde über die Zeit photometrisch bestimmt. Mittelwerte und Standardabweichung ergeben sich aus den Werten von drei unabhängigen Experimenten.

Da die Deletion von *gpsB* einen Einfluss auf die Penicillin- und Lysozymresistenz hat, sollte nun überprüft werden, ob sich die Abwesenheit von *gpsB* auf die Ultrastruktur der Zellwand auswirkt. Dazu wurden durch die Kooperationspartner Lars Möller und Gudrun Holland (ZBS4, RKI Berlin) TEM-Aufnahmen angefertigt. Die Zellwände des Stammes LMJR19 (Δ *gpsB*) weisen jedoch keine signifikanten Unterschiede in Struktur und Dicke im Vergleich zum Wildtypstamm auf (Abb. 19).

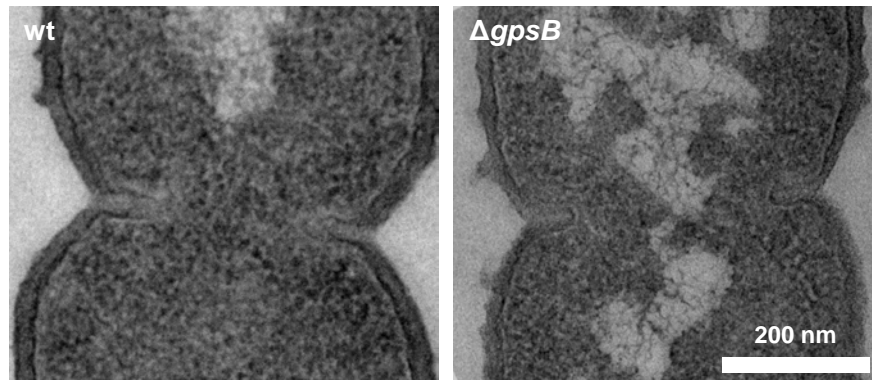


Abb. 19: Einfluss der Deletion von *gpsB* auf die Zellwandstruktur von *L. monocytogenes*

Die *L. monocytogenes*-Stämme EGD-e (wt) und LMJR19 (Δ *gpsB*) wurden bis zur mittleren logarithmischen Wachstumsphase angezogen. Anschließend wurden die Zellen fixiert, eingebettet und Dünnschnitte der Proben angefertigt, die mit Hilfe von Transmissions-Elektronenmikroskopie untersucht wurden. Die Aufnahmen wurden von Lars Möller und Gudrun Holland zur Verfügung gestellt (Rismondo *et al.*, 2015a).

Aufgrund dessen wurde die Zusammensetzung des Peptidoglykans der Δ *gpsB*-Mutante durch die Kooperationspartner Prof. Dr. Waldemar Vollmer und Christine Aldridge (Newcastle University) bestimmt (Rismondo *et al.*, 2015a). Die relative Häufigkeit der deacetylierten Komponenten Tri[deAc] und TetraTri[deAc]₂ des Peptidoglykans war im Stamm LMJR19 (Δ *gpsB*) um 1,6% und 2,7% erhöht, wohingegen die Häufigkeit der acetylierten Komponenten Tri und TetraTri um 0,6% und 3% reduziert war. Der Stamm LMS56 (*lgpsB*) wies unter Induktionsbedingungen eine Peptidoglykan-Zusammensetzung auf, die mit dem Wildtypstamm vergleichbar ist (Abb. 20), der Effekt konnte somit komplementiert werden. Die Quervernetzung wurde durch die Deletion von *gpsB* nicht beeinflusst (Abb. 20C). Diese Ergebnisse konnten auch in einer zweiten Muropeptidanalyse bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Somit führte die Deletion von *gpsB* zu einem erhöhten Grad an Deacetylierung, wohingegen die Depletion von PBP B1 (LMJR27-IPTG) zu einem erhöhten Acetylierungsgrad führte (Abb. 17C und Abb. 20C).

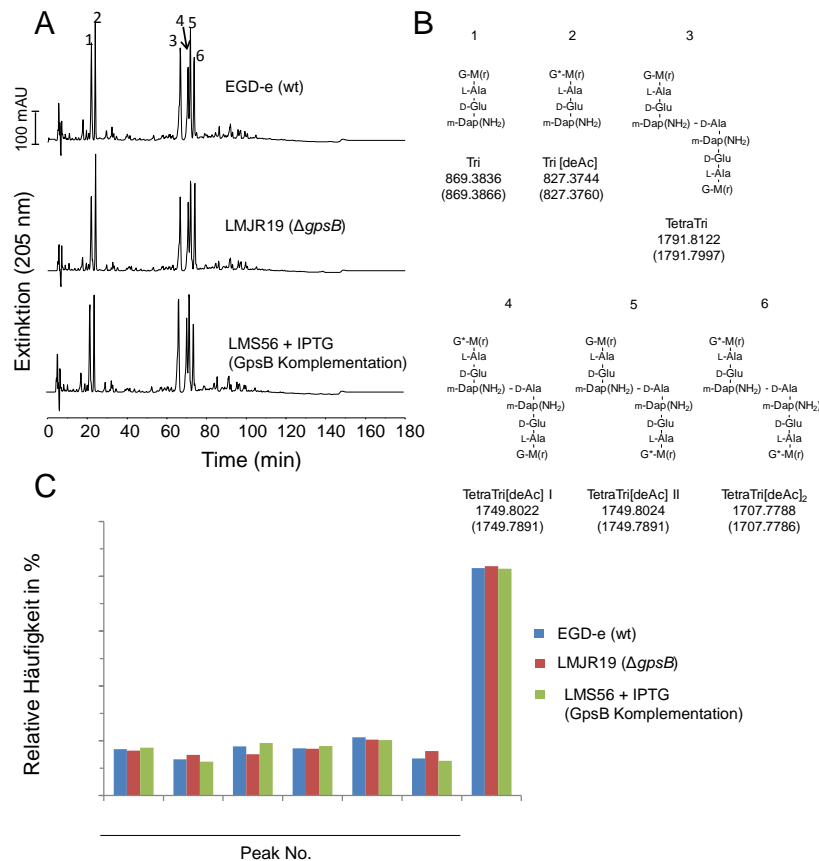


Abb. 20: Peptidoglykan-Zusammensetzung der $\Delta gpsB$ -Mutante

(A) Muropeptidprofile der *gpsB*-Mutanten, die mittels HPLC ermittelt wurden. Die prominenten Muropeptid-Peaks sind nummeriert. (B) Muropeptidstrukturen, die vermutlich den prominenten Muropeptid-Peaks aus (A) zuzuordnen sind. Die Namen der Muropeptide und die ermittelten m/z-Werte sind unter den jeweiligen Strukturen angegeben. Der obere Wert entspricht dem ermittelten m/z-Wert, der untere (in Klammern) dem theoretischen m/z-Wert. G, N-Acetylglucosamin; G*, Glucosamin; M, N-Acetyl-muraminsäure; m-Dap(NH₂), amidierter meso-Diamino-pimelinsäure. TetraTri[deAc] liegt in zwei isomeren Formen vor (I und II), bei denen die Position von G und G* nicht bekannt sind. (C) Relative Häufigkeit der Muropeptide 1-6 und der prozentuale Anteil der Peptide in Cross-Links (CL).

3.3.9. Virulenz der *pbp*-Mutanten

Um den Einfluss der Deletion bzw. Depletion der HMW PBPs auf die Virulenz von *L. monocytogenes* zu bestimmen, wurden Infektionsexperimente unter Verwendung verschiedener Zelllinien durchgeführt. Zur Bestimmung der Invasionsrate der *pbp*-Mutantenstämme in eukaryotische Zellen wurden exponentiell wachsende Kulturen verwendet, um einen einschichtigen HeLa-Zellrasen zu infizieren. Die Depletionsstämme LMJR18 (*IpbpB2*) und LMJR27 (*IpbpB1*) wurden für die Infektionsexperimente in Anwesenheit von IPTG über Nacht angezogen, gewaschen und in frischem BHI-Medium mit und ohne IPTG inkubiert. $1,5 \pm 0,2$ % (n=3) der Wildtypzellen, die im Inokulum vorhanden waren, konnten in die HeLa-Zellen eindringen (Abb. 21A). Dies entspricht ungefähr den publizierten Invasionsraten von *L. monocytogenes* (Gaillard *et al.*, 1991). Die Invasionsraten der Stämme LMS57 ($\Delta pbpA1$) und LMS64 ($\Delta pbpA2$) lagen bei ca. $26,6 \pm 8,1$ % bzw.

13,3±8,7% der Invasionsrate des Wildtypstammes (Abb. 21A). Darüber hinaus führte die Depletion von PBP B1 (LMJR27) und PBP B2 (LMJR18) zu einer 7- bzw. 22-fachen Reduktion der Invasionsrate. Allerdings konnte die Invasion durch Zugabe von IPTG lediglich auf 52,9±5,8% (PBP B1) bzw. 50,1±8,1% (PBP B2) des Wildtyp-Niveaus gesteigert werden (Abb. 21B). Im Gegensatz dazu war die Invasionsrate der $\Delta pbpB3$ -Deletionsmutante (LMJR41) höher als die vom Wildtypstamm (130,1±19,9 %, Abb. 21B). Die Penicillin-bindenden Proteine PBP A1, PBP A2, PBP B1 und PBP B2 spielen somit eine Rolle in der Invasion von *L. monocytogenes*.

Zur Untersuchung der Fähigkeit zur Zell-zu-Zell-Ausbreitung der *pbp*-Mutanten wurde ein Plaque-Formation-Assay mit 3T3-Mausembryo-Fibroblasten durchgeführt. *L. monocytogenes* infiziert diese Zelllinie punktuell und breitet sich von Zelle zu Zelle aus. Dadurch werden Bereiche gebildet, in denen die Wirtszelle abgetötet ist. Nach Färbung mit Neutralrot werden diese Bereiche als farblose Plaques sichtbar (Abb. 21C). Die Abwesenheit von PBP A1 (LMS57) äußerte sich in einer reduzierten Plaquegröße, die Plaqueanzahl ist jedoch vergleichbar zum Wildtypstamm. Im Gegensatz dazu war die Plaqueanzahl infolge der Deletion von *pbpA2* (LMS64) reduziert, die Deletion hatte hingegen keinen Einfluss auf die Plaquegröße (Abb. 21C). Daraus lässt sich schließen, dass PBP A1 für die Zell-zu-Zell-Ausbreitung benötigt wird, wohingegen PBP A2 an der Invasion in diesen Zelltyp beteiligt ist. Da die Depletion von PBP B1 (LMJR27) und PBP B2 (LMJR18) zu einer drastischen Reduktion der Invasionsrate von HeLa-Zellen führt, wurden die beiden Depletionsstämme für die Untersuchung der Zell-zu-Zellausbreitung in Anwesenheit von IPTG angezogen. Dadurch sollte eine mit dem Wildtypstamm vergleichbare Invasionsrate erhalten werden. Nach der Infektion wurden die Zellen in An- und Abwesenheit von IPTG kultiviert. Zellen, die in PBP B1 (LMJR27) und PBP B2 (LMJR18) depletiert sind, konnten keine Plaques bilden und sich somit nicht ausbreiten. In Anwesenheit von IPTG wurden hingegen Plaques gebildet, die jedoch eine geringere Größe aufwiesen als die Plaques des Wildtypstammes (Abb. 21C). Die Plaquebildung wurde durch die Deletion von *pbpB3* (LMJR41) nicht beeinflusst. Somit sind PBP A1, PBP B1 und PBP B2 für die Zell-zu-Zellausbreitung von großer Bedeutung.

Um den Einfluss der Deletion von *pbpA1*, *pbpA2* und *pbpB3* auf die intrazelluläre Replikation zu bestimmen, wurden J774.A1-Mausmakrophagen infiziert. In diesem Infektionsexperiment konnte gezeigt werden, dass die intrazelluläre Replikation der getesteten Stämme vergleichbar zum Wildtypstamm ist (Abb. 21D). Zudem hat die Deletion von *pbpA1*, *pbpA2* und *pbpB3* keinen Einfluss auf die Phagozytose durch J774.A1-Mausmakrophagen (t=0 h, Abb. 21D). Bei Verwendung von HeLa-Zellen wird, wie bereits beschrieben, der Invasionsdefekt der

$\Delta pbpA1$ - und $\Delta pbpA2$ -Deletionsmutanten (LMS57 und LMS64) deutlich. Die intrazelluläre Replikation ist jedoch vergleichbar mit dem Wildtypstamm (Abb. 21E), wodurch gesagt werden kann, dass die Penicillin-bindenden Proteine keinen Einfluss auf diesen Prozess haben.

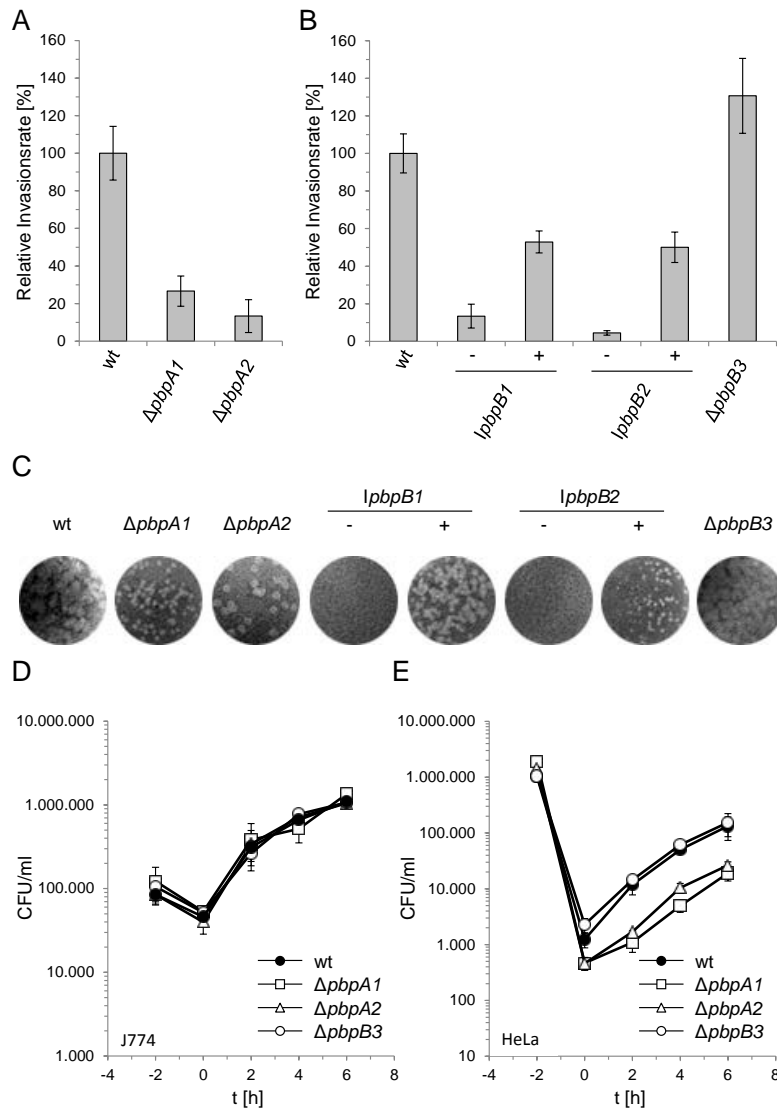


Abb. 21: Einfluss der HMW-PBPs auf die Virulenz von *L. monocytogenes*

(A-B) Invasionsrate von *L. monocytogenes* *pbp*-Mutanten in HeLa-Zellen. Die Stämme EGD-e (wt), LMS57 ($\Delta pbpA1$), LMS64 ($\Delta pbpA2$), LMJR18 ($\Delta lppB2$), LMJR27 ($\Delta lppB1$) und LMJR41 ($\Delta pbpB3$) wurden bis zur mittleren logarithmischen Wachstumsphase in BHI bei 37°C angezogen und anschließend zur Infektion eines einschichtigen HeLa-Zellrasens verwendet. Nach 2-stündiger Inkubation bei 37°C wurden Proben entnommen. Die Invasionsrate ergibt sich aus dem Verhältnis der eingedrungenen Zellen (t=0) zur Gesamtzellzahl des Inokulums (t=-2). (C) Plaque-Formation-Assay zur Analyse der Zell-zu-Zell-Ausbreitung. Die Stämme aus (A-B) wurden wie beschrieben angezogen und anschließend verwendet, um eine konfluente Schicht von embryonalen 3T3-Maus-Fibroblasten zu infizieren. Plaques wurden drei Tage nach der Infektion mit Neutralrot angefärbt. Sie werden dort sichtbar, wo die Wirtszellen getötet wurden. (D) Intrazelluläre Replikation von *L. monocytogenes* *pbp*-Mutanten in J774.A1 Makrophagen. Vorkulturen der Stämme EGD-e (wt), LMS57 ($\Delta pbpA1$), LMS64 ($\Delta pbpA2$) und LMJR41 ($\Delta pbpB3$) wurden auf eine OD₆₀₀=0,2 eingestellt und zur Infektion eines einschichtigen Zellrasens von J774.A1 Makrophagen eingesetzt. Die Probenentnahme erfolgte nach der Infektion (t=0) und anschließend in 2 h-Intervallen. (E) Intrazelluläre Replikation von *L. monocytogenes* *pbp*-Mutanten in HeLa-Zellen. Das Experiment wurde wie in (A) beschrieben durchgeführt. Zur Bestimmung der intrazellulären Replikation wurden zusätzlich Proben in 2 h-Intervallen entnommen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen ergeben sich aus Experimenten, die in Triplikaten durchgeführt wurden.

3.4. Die Deletion von *gpsB* führt zur verringerten Virulenz

Frühere Arbeiten zeigen, dass GpsB an der Lokalisation von PonA (PBP1) in *B. subtilis* verantwortlich ist (Claessen *et al.*, 2008). Aufgrund dessen stellte sich die Frage, ob sich die Deletion von *gpsB* ebenfalls in der Virulenz von *L. monocytogenes* manifestiert. Weiterhin konnte bereits gezeigt werden, dass DivIVA essenziell für die Virulenz von *L. monocytogenes* ist (Halbedel *et al.*, 2012). Zur Untersuchung der Phagozytose von *L. monocytogenes* durch Makrophagen und der intrazellulären Replikation der Δ *gpsB*-Deletionsmutante wurden J774.A1-Mausmakrophagen verwendet. Die Phagozytose von *L. monocytogenes* wurde durch die Deletion von *gpsB* nicht beeinflusst ($t=0$, Abb. 22A). Die intrazelluläre Replikation von LMJR19 (Δ *gpsB*) war nach 6-stündiger Inkubation hingegen 4-fach niedriger als die vom Wildtypstamm (Abb. 22A). In einem Plaque-Formation-Assay konnte gezeigt werden, dass die Zell-zu-Zellausbreitung infolge der Deletion von *gpsB* leicht reduziert war, was sich in der Ausbildung kleinerer Plaques manifestierte (Abb. 22B). Der Wachstumsdefekt der Δ *gpsB*-Mutante, der bei 37°C beobachtet werden konnte, spiegelt sich also in den verschiedenen Infektionsexperimenten auch in einer reduzierten intrazellulären Replikation wieder.

Die Kooperationspartner Dr. Torsten Hain und Gopala Krishna Mannala (Universität Gießen) führten ein Infektionsexperiment mit *Galleria mellonella* (Wachsmottenlarven) durch (Rismondo *et al.*, 2015a). Lediglich $43,3 \pm 5,8\%$ der Larven, die mit dem Wildtypstamm infiziert wurden, waren 7 Tage nach der Injektion noch am Leben. Im Gegensatz dazu überlebten $90 \pm 10\%$ der Larven, die mit dem Stamm LMJR19 (Δ *gpsB*) infiziert wurden (Abb. 22C). Diese Attenuation der Δ *gpsB*-Mutante ist vergleichbar mit einer Mutante, bei der die gesamte Pathogenitätsinsel LIPI-1 deletiert wurde, welche sechs der wichtigsten Virulenzfaktoren von *L. monocytogenes* codiert (*prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* und *plcB*) (Mukherjee *et al.*, 2010). Aufgrund dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass GpsB, neben DivIVA, eine wichtige Rolle für die Pathogenität von *L. monocytogenes* spielt.

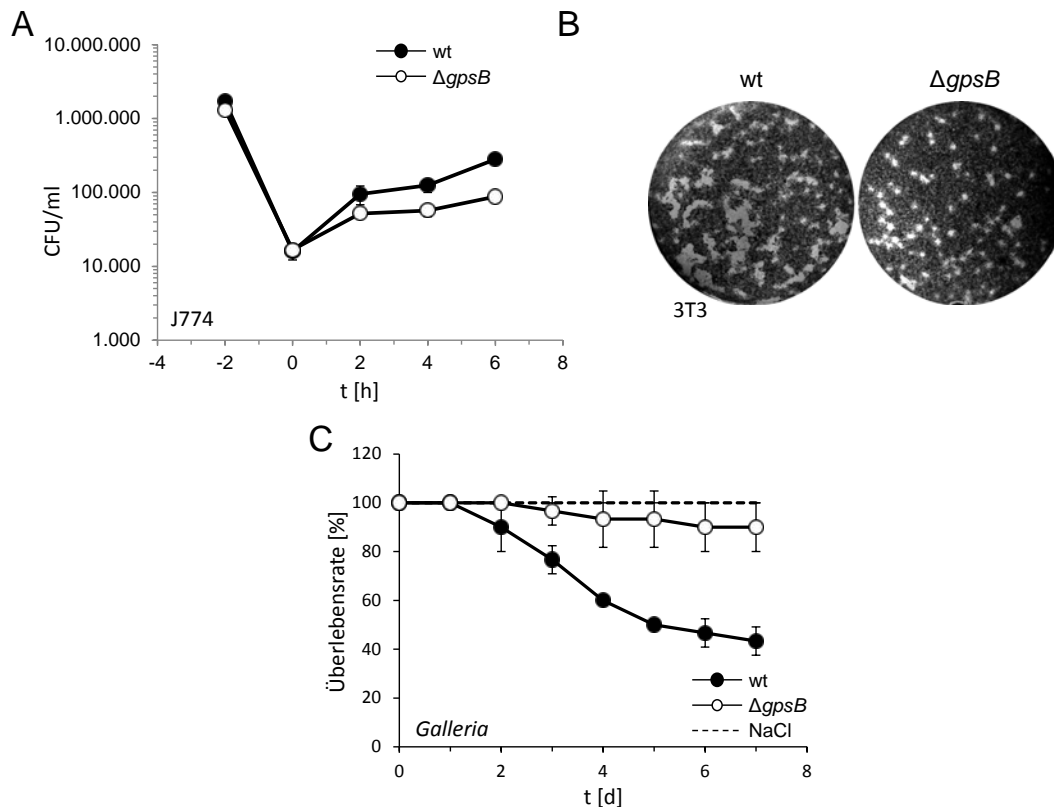


Abb. 22: Einfluss der Deletion von *gpsB* auf die Pathogenität von *L. monocytogenes*

(A) Intrazelluläre Replikation von *L. monocytogenes* in J774.A1 Mausemakrophagen. Vorkulturen der Stämme EGD-e (wt) und LMJR19 ($\Delta gpsB$) wurden verwendet, um einen einschichtigen Zellrasen von J774.A1 Mausemakrophagen zu infizieren. Die intrazelluläre Vermehrung wurde durch Probenentnahmen, die alle 2 h erfolgten, quantifiziert. (B) Plaque-Formation-Assay zur Analyse der Zell-zu-Zell-Ausbreitung. Die Stämme EGD-e (wt) und LMJR19 ($\Delta gpsB$) wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen und dazu verwendet, eine konfluente Schicht von embryonalen 3T3-Maus-Fibroblasten zu infizieren. Plaques wurden drei Tage nach der Infektion mit Neutralrot angefärbt. Sie werden dort sichtbar, wo die Wirtszellen getötet wurden. (C) Überlebensrate von *Galleria mellonella* nach Infektion mit EGD-e (wt) und LMJR19 ($\Delta gpsB$). Die Injektion von 0,9%-iger NaCl-Lösung in die Wachsmottenlarven diente als Kontrolle. Die Ergebnisse resultieren aus drei unabhängigen Infektionsexperimenten unter Verwendung von jeweils 10 Larven.

3.5. Eine $\Delta gpsB \Delta divIVA$ -Doppelmutante hat einen starken Zellteilungsdefekt

Da die Deletion von *gpsB* und von *divIVA* zu einer stark reduzierten Virulenz von *L. monocytogenes* führte, wurde eine $\Delta gpsB \Delta divIVA$ -Doppelmutante hergestellt, um zu sehen, ob die Kombination zu einem stärkeren Phänotyp als die der Einzelmutanten führt. Der Stamm LMJR28 ($\Delta gpsB \Delta divIVA$) zeigte in J774.A1-Infektionsexperimenten eine zu $\Delta divIVA$ vergleichbare Attenuation (Daten nicht gezeigt).

Beim Vergleich der Wachstumseigenschaften der Einzelmutanten und der $\Delta gpsB \Delta divIVA$ -Doppelmutante zeigte sich, dass die Deletion von *divIVA* den Wachstumsdefekt der $\Delta gpsB$ -Mutante bei 42°C partiell supprimiert (Abb. A5A). Da die Autolysinsekretion in einer $\Delta divIVA$ -Mutante beeinträchtigt ist, wurde eine $\Delta gpsB \Delta secA2$ -Doppelmutante konstruiert (Halbedel *et al.*, 2012). SecA2 ist eine akzessorische ATPase, die die Translokation von Proteinen, darunter die Autolysine p60 (*lmo0582*) und MurA (*lmo2961*), über die

zytoplasmatische Membran vermittelt (Lenz und Portnoy, 2002, Lenz *et al.*, 2003, Halbedel *et al.*, 2012). Die Deletion von *secA2* in der $\Delta gpsB$ -Mutante führte ebenfalls zu einer partiellen Suppression des Wachstumsdefektes bei 42°C (Abb. A5B). Daher ist davon auszugehen, dass das gesteigerte Wachstum auf der Reduktion der Autolysinsekretion beruht.

Neben dem Defekt in der Autolysinsekretion weist die $\Delta divIVA$ -Mutante einen Zellteilungsdefekt auf (Kaval *et al.*, 2014). Daher wurden die Zellmembranen der $\Delta gpsB$ - und $\Delta divIVA$ -Einzelmutante und der $\Delta gpsB \Delta divIVA$ -Doppelmutante mit Nilrot gefärbt und die Zelllänge von je 300 Zellen bestimmt (Abb. A5C). Dabei wurde deutlich, dass sowohl die $\Delta divIVA$ -Mutante ($1,39 \pm 0,5 \mu m$) als auch die $\Delta gpsB$ -Mutante ($1,41 \pm 0,4 \mu m$) längere Zellen aufwiesen als der Wildtypstamm ($1,25 \pm 0,2 \mu m$, Abb. A5D). Das deckt sich auch mit den REM-Aufnahmen der $\Delta gpsB$ -Mutante (Abb. 8B). Im Gegensatz dazu hat die $\Delta gpsB \Delta divIVA$ -Doppelmutante ($2,46 \pm 1,4 \mu m$) die doppelte Zelllänge im Vergleich zu den Einzelmutanten (Abb. A5D). Die Zelllängen des Stammes LMJR28 ($\Delta gpsB \Delta divIVA$) waren sehr heterogen und wiesen Zelllängen von bis zu 9,6 μm auf. Zudem waren die Zellen der $\Delta gpsB \Delta divIVA$ -Doppelmutante ($0,39 \pm 0,04 \mu m$) dünner als die der $\Delta divIVA$ - und $\Delta gpsB$ -Einzelmutante ($0,47 \pm 0,04 \mu m$ und $0,45 \pm 0,05 \mu m$) und die des Wildtypstammes ($0,46 \pm 0,04 \mu m$). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass GpsB und DivIVA, auch aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit ihres N-Terminus, ähnliche oder überlappende Funktionen während der Zellteilung haben.

3.6. GpsB reguliert die Aktivität von PBP A1

3.6.1. Die Deletion von *pbpA1* supprimiert den $\Delta gpsB$ -Phänotyp

Bacterial Two-Hybrid (B2H)-Assays wiesen Interaktionen zwischen *L. monocytogenes* GpsB und 4 der 5 HMW PBPs (PBP A1, PBP B1-3) nach. Zudem konnte gezeigt werden, dass diese PBPs mit der LBD von GpsB interagieren (Dr. Stephanie Großhennig, persönliche Mitteilung). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass ein funktioneller Zusammenhang zwischen GpsB und diesen PBPs bestehen könnte. Es ist bereits bekannt, dass GpsB an der Lokalisation von PBP1 in *B. subtilis* verantwortlich ist (Claessen *et al.*, 2008). In *S. pneumoniae* stellt GpsB vermutlich die Verbindung zwischen FtsZ und anderen Proteinen, die während der Zellteilung am Ringschluss beteiligt sind, wie z.B. Pbp2x, her (Land *et al.*, 2013). Um herauszufinden, ob GpsB für die Regulation eines Penicillin-bindenden Proteins in *L. monocytogenes* verantwortlich ist, wurden alle HMW PBPs als zweite, IPTG-induzierbare ektopische Kopie ins Chromosom der $\Delta gpsB$ -Mutante integriert. Der Stamm LMJR33 ($\Delta gpsB+pbpA1$), der eine Kopie von *pbpA1* besitzt, zeigte einen Wachstumsdefekt, wenn er

auf BHI-Platten ausgestrichen wurde, die IPTG enthielten. Die zusätzliche Expression der anderen vier PBPs in der $\Delta gpsB$ -Mutante hatte keinen Einfluss auf das Wachstum (Abb. 23A). Die Überexpression von *pbpA1* in der $\Delta gpsB$ -Mutante führte auch in BHI-Flüssigmedium zu einem Wachstumsdefekt bei 37°C, der bei der Überexpression von *pbpA1* im Wildtyp Hintergrund (LMJR39) nicht beobachtet werden konnte (Abb. 23B). Zum Nachweis der Überexpression von *pbpA1* wurden die PBPs aus den Proteinextrakten der Stämme LMJR33 ($\Delta gpsB+pbpA1$) und LMJR39 (wt+*pbpA1*) mit Bocillin-FL markiert, als Kontrolle wurden der Wildtypstamm EGD-e und der Stamm LMJR19 ($\Delta gpsB$) mitgeführt. Das PBP-Fluoreszenzgel zeigte, dass eine deutlich intensivere PBP A1-Bande bei Anwesenheit von IPTG in den Extrakten der Stämme LMJR33 und LMJR39 detektiert werden konnte (Abb. A6).

Da die Überexpression von *pbpA1* das Wachstum der $\Delta gpsB$ -Mutante beeinträchtigt, wurde vermutet, dass ein funktioneller Zusammenhang zwischen diesen beiden Proteinen besteht. Möglicherweise kommt es in der $\Delta gpsB$ -Mutante zu einer Deregulation der Aktivität von PBP A1. Sofern diese Hypothese zutrifft, sollte die Deletion von *pbpA1* in der $\Delta gpsB$ -Mutante den gegenteiligen Effekt auf das Wachstum haben. Der Stamm LMJR38 ($\Delta gpsB \Delta pbpA1$) zeigte bei 37°C den gleichen Wachstumsdefekt wie der Stamm LMJR19 ($\Delta gpsB$, Daten nicht gezeigt), jedoch wurde der Wachstumsdefekt der $\Delta gpsB$ -Mutante bei 42°C durch die zusätzliche Deletion von *pbpA1* partiell supprimiert (Abb. 23C). Darüber hinaus reduzierte die Deletion von *pbpA1* in der $\Delta gpsB \Delta divIVA$ -Doppelmutante deren Zelllänge auf das Niveau der $\Delta gpsB$ -Einzelmutante (Abb. 23E). Daher ist davon auszugehen, dass der Zellteilungsdefekt der $\Delta gpsB \Delta divIVA$ -Doppelmutante durch PBP A1 verursacht wird. Da die Suppression des Zellteilungs- und Wachstumsdefektes nur partiell ist, scheinen jedoch noch weitere Faktoren an dem $\Delta gpsB$ -Phänotyp beteiligt zu sein.

Zudem konnte gezeigt werden, dass die Deletion von *pbpA1* in der $\Delta gpsB$ -Mutante zur Reduktion der erhöhten Lysozymresistenz der $\Delta gpsB$ -Mutante führte. Die $\Delta gpsB \Delta pbpA1$ -Doppelmutante wies dabei sogar eine niedrigere Resistenz gegenüber Lysozym auf als der Wildtypstamm (Abb. 23D). Die Lysozymresistenz der $\Delta gpsB$ -Mutante wird somit über einen Prozess vermittelt, an dem PBP A1 beteiligt ist.

Unter Verwendung einer GFP-PBP A1-Fusion wurde die Lokalisation von PBP A1 überprüft. Dabei zeigten sich keine Unterschiede zwischen dem Wildtypstamm (LMS44) und der $\Delta gpsB$ -Mutante (LMJR29). GFP-PBP A1 lokalisierte hauptsächlich am Septum und partiell an der Zellperipherie (Abb. A7A). Mit Hilfe von Van-FL, einem Fluorescein-markierten Vancomycin, kann die naszierende Peptidoglykansynthese in Bakterienzellen nachgewiesen

werden. Hierbei zeigten sich bei der $\Delta gpbB$ -Mutante ebenfalls keine Veränderungen im Vergleich zum Wildtypstamm (Abb. A7B). GpsB hat somit keinen Einfluss auf die Lokalisation von PBP A1.

3.6.2. GpsB reguliert die Aktivität von PBP A1

Da die gleichzeitige Deletion von *pbpA1* und *pbpA2* in *L. monocytogenes* nicht toleriert werden kann, sollte die Beteiligung von GpsB an der PBP A1-Aktivität durch Konstruktion einer $\Delta gpbB \Delta pbpA2$ -Doppelmutante überprüft werden. Mehrere Versuche, *pbpA2* im Stamm LMJR19 ($\Delta gpbB$) zu deletieren, scheiterten, was auf eine Letalität dieser Kombination schließen lässt. Daher wurde eine $\Delta pbpA2$ -Deletionsmutante hergestellt, die lediglich eine ektopische IPTG-induzierbare Kopie von *gpsB* im Chromosom besitzt (LMJR108 – *IgpsB \Delta pbpA2*). Für Wachstumsexperimente wurde GpsB im Stamm LMJR108 vordepletiert, d.h. der Stamm wurde über 24 h in Abwesenheit des Induktors kultiviert und anschließend zum Beimpfen einer frischen BHI-Kultur mit und ohne IPTG verwendet. In Anwesenheit von IPTG konnte LMJR108 (*IgpsB \Delta pbpA2*) bei 37°C wachsen, bei Abwesenheit zeigte sich jedoch ein starker Wachstumsdefekt dieser Mutante (Abb. 23F). PBP A2 wird somit in Abwesenheit von GpsB essenziell, was bedeutet, dass die Aktivität von PBP A1 in der $\Delta gpbB$ -Mutante stark beeinträchtigt ist und die Funktion nicht mehr ausreichend ausüben kann. Demnach wird die Transglykosylase-Aktivität in Abwesenheit von GpsB und PBP A2 (LMJR108) sehr stark reduziert sein, wodurch das Peptidoglykan des Stammes LMJR108 (*IgpsB \Delta pbpA2*) geschwächt ist und die Zellen lysieren.

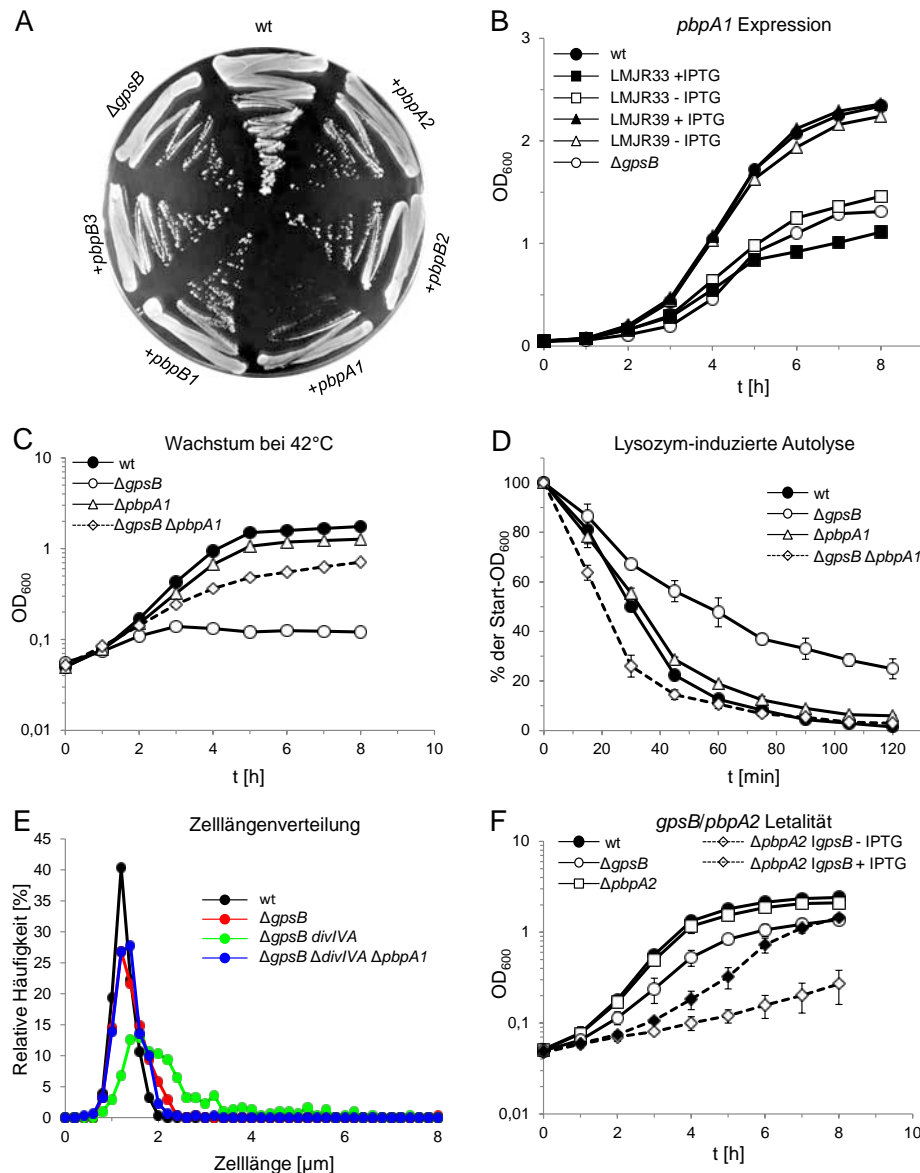


Abb. 23: GpsB ist an der Regulation der PBP A1-Aktivität beteiligt

(A) Überexpression der HMW PBPs in der Δ gpsB-Mutante. Die Stämme EGD-e (wt), LMJR19 (Δ gpsB), LMJR31 (Δ gpsB+*pbpB3*), LMJR32 (Δ gpsB+*pbpB1*), LMJR33 (Δ gpsB+*pbpA1*), LMJR34 (Δ gpsB+*pbpB2*) und LMJR35 (Δ gpsB+*pbpA2*) wurden auf BHI-Platten, die 1 mM IPTG enthalten, ausgestrichen und bei 37°C inkubiert. (B) Einfluss der Überexpression von *pbpA1* auf das Wachstum von EGD-e und der Δ gpsB-Mutante in Flüssigkultur. Die Stämme EGD-e (wt), LMJR19 (Δ gpsB), LMJR33 (Δ gpsB+*pbpA1*) und LMJR39 (wt+*pbpA1*) wurden in BHI-Medium \pm 1 mM IPTG bei 37°C kultiviert. (C) Suppression des Wachstumsdefektes der Δ gpsB-Mutante bei 42°C durch Deletion von *pbpA1*. Das Wachstum der Stämme EGD-e (wt), LMJR19 (Δ gpsB), LMS57 (Δ pbpA1) und LMJR38 (Δ gpsB Δ pbpA1) wurde während der Anzucht bei 42°C in BHI-Medium verfolgt. (D) Reduzierte Lysozymresistenz einer Δ gpsB Δ pbpA1-Mutante. Die Stämme aus (C) wurden in BHI-Medium bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀≈0,8 angezogen. Nach Zentrifugation wurde das entstandene Zellpellet in 50 mM Tris-HCl-Puffer pH8,0 resuspendiert und 2,5 μg/ml Lysozym zugegeben. Die Abnahme der optischen Dichte (λ=600 nm) wurde über die Zeit photometrisch bestimmt. (E) Zelllängenverteilung der Stämme EGD-e (wt), LMJR19 (Δ gpsB), LMJR28 (Δ gpsB Δ divIVA) und LMJR42 (Δ gpsB Δ divIVA Δ pbpA1) nach Anzucht in BHI-Medium bei 37°C bis zur mittleren logarithmischen Wachstumsphase. Von jedem Stamm wurde die Zelllänge von 300 Zellen bestimmt. (F) Synthetische Letalität von *gpsB* und *pbpA2*. Zur vollständigen Depletion von GpsB im Stamm LMJR108 (*igpsB* Δ pbpA2) wurde eine Vorkultur mit IPTG kultiviert, gewaschen und zur Beimpfung von frischem BHI-Medium ohne IPTG verwendet. Diese wurde 24 h bei 37°C inkubiert und anschließend für die Wachstumskurve eingesetzt. Die Stämme EGD-e (wt), LMJR19 (Δ gpsB), LMS64 (Δ pbpA2) und LMJR108 (*igpsB* Δ pbpA2) wurden in BHI-Medium \pm 1 mM IPTG bei 37°C kultiviert und die optische Dichte (λ=600 nm) stündlich bestimmt. Mittelwerte und Standardabweichungen ergeben sich aus drei unabhängigen Experimenten.

3.6.3. Ein Ungleichgewicht zwischen Transpeptidierung und Transglykosylierung in der $\Delta gpsB$ -Mutante

L. monocytogenes PBP A1 ist ein bi-funktionales Penicillin-bindendes Protein, d.h. es besitzt Transglykosylase (TG)- und Transpeptidase (TP)-Aktivität. Um herauszufinden, ob GpsB die Aktivität der Transpeptidase, der Transglykosylase oder beider Domänen beeinflusst, wurden Mutationen in den konservierten Motiven eingefügt und auf ihren Effekt auf das Wachstum der $\Delta gpsB$ -Mutante getestet (Abb. 24A). Die konservierten Motive der Transglykosylase von *L. monocytogenes* sind E₁₁₆DxxFxxHxG, G₁₄₇xSTxTQQ, R₁₇₀KxxE, K₁₈₇xxIxxxYxN und R₂₅₂xxxxL und die konservierten Bereiche der Transpeptidase bestehen aus den Motiven S₃₉₀xxK, S₄₄₆xN und K₅₇₀TG (Zawadzka-Skomial *et al.*, 2006, Jeong *et al.*, 2013). Alle PBP A1-Varianten wurden mit einem C-terminalen Flag-tag versehen und im $\Delta gpsB \Delta pbpA1$ -Hintergrund exprimiert. Die Expression von *pbpA1-flag* infolge der Anwesenheit des Induktors führte in der $\Delta gpsB \Delta pbpA1$ -Mutante (LMJR60+IPTG) zu dem bereits in Abb. 23B beschriebenen Wachstumsdefekt. Somit kann davon ausgegangen werden, dass das Fusionsprotein exprimiert wird und funktionell ist. Dahingegen resultierte die Expression von *pbpA1-flag* mit Mutation von F120 und S149/T150 zu Alanin im $\Delta gpsB \Delta pbpA1$ -Hintergrund (LMJR58 und LMJR61) in keiner Veränderung des Wachstumsverhaltens im Vergleich zur $\Delta gpsB \Delta pbpA1$ -Doppelmutante (LMJR38). Die Stämme LMJR58 ($\Delta gpsB \Delta pbpA1$ pIMK3-*pbpA1F120A-flag*) und LMJR61 ($\Delta gpsB \Delta pbpA1$ pIMK3-*pbpA1S149A T150A-flag*) hatten im Vergleich zum Stamm LMJR60, der das Wildtyp *pbpA1-flag*-Allel exprimiert, einen Wachstumsvorteil (Abb. 24B-C). Daraus kann geschlossen werden, dass die PBP A1-Flag-Proteine mit den Mutationen F120A und S149A/T150A inaktiv sind. In Abwesenheit von IPTG wuchsen die Stämme LMJR58 ($\Delta gpsB \Delta pbpA1$ pIMK3-*pbpA1F120A-flag*) und LMJR61 ($\Delta gpsB \Delta pbpA1$ pIMK3-*pbpA1S149A T150A-flag*) wie der Stamm LMJR38 ($\Delta gpsB \Delta pbpA1$, Daten nicht gezeigt). Die Expression der mutierten *pbpA1-flag*-Varianten im $\Delta pbpA1$ -Hintergrund (LMJR52 - $\Delta pbpA1$ pIMK3-*pbpA1F120A-flag*, LMJR53 - $\Delta pbpA1$ pIMK3-*pbpA1S149A T150A-flag*) resultierte in einem leichten Wachstumsdefekt, der jedoch vergleichbar mit dem Wachstumsdefekt von LMJR49 ($\Delta pbpA1$ pIMK3-*pbpA1-flag*) ist, der das Wildtyp *pbpA1-flag*-Allel exprimiert (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu führte die Expression von *pbpA1-flag* mit Mutationen in der TP-Domäne, S390A, S446A und T571A, dazu, dass die Stämme LMJR59 ($\Delta gpsB \Delta pbpA1$ pIMK3-*pbpA1S446A-flag*), LMJR62 ($\Delta gpsB \Delta pbpA1$ pIMK3-*pbpA1S390A-flag*) und LMJR63 ($\Delta gpsB \Delta pbpA1$ pIMK3-*pbpA1T571A-flag*) in Gegenwart von IPTG nicht mehr wachsen konnten (Abb. 24C). In Abwesenheit von IPTG wiesen diese Stämme ein zu LMJR38 ($\Delta gpsB \Delta pbpA1$)

vergleichbares Wachstum auf (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus wuchsen die Stämme LMJR54 ($\Delta pbpA1$ pIMK3-*pbpA1*S390A-*flag*), LMJR55 ($\Delta pbpA1$ pIMK3-*pbpA1*S446A-*flag*) und LMJR56 ($\Delta pbpA1$ pIMK3-*pbpA1*T571A-*flag*) in Anwesenheit von IPTG wie der Stamm LMJR49 ($\Delta pbpA1$ pIMK3-*pbpA1*-*flag*), der das Wildtyp *pbpA1*-*flag*-Allel exprimiert (Daten nicht gezeigt). Die TP-Mutationen führen lediglich zur Inaktivierung der Transpeptidase, während die Aktivität der Transglykosylase nicht beeinträchtigt wird (Rogers *et al.*, 1980, Ward, 1984, Kohlrausch und Höltje, 1991, Born *et al.*, 2006). Scheinbar ist die $\Delta gpsB$ -Mutante überempfindlich gegenüber einer von ihrer TP-Aktivität entkoppelten Transglykosylase-Aktivität in PBP A1.

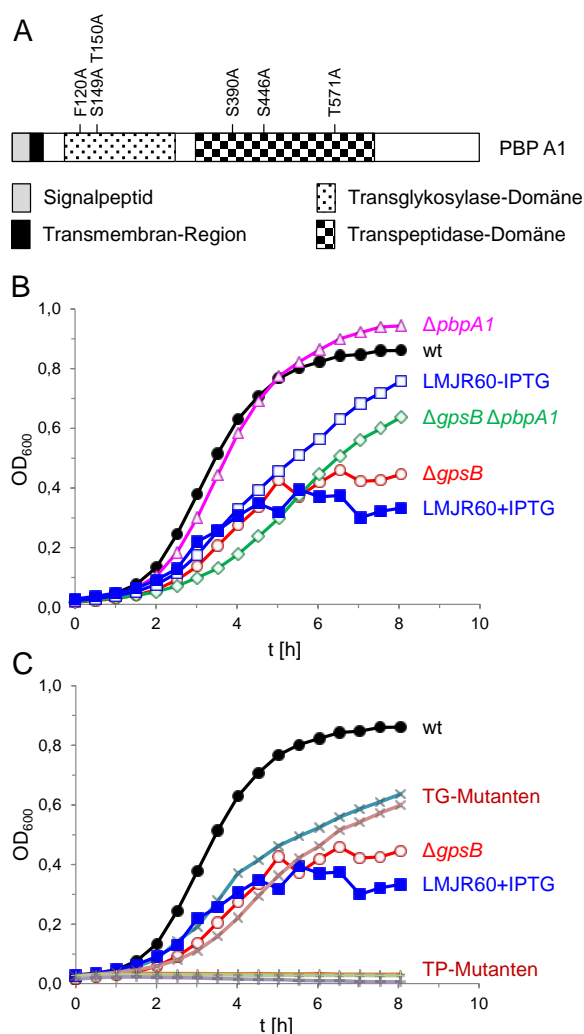


Abb. 24: Mutationen in der Transpeptidase-Domäne von PBP A1 sind letal in der *L. monocytogenes* $\Delta gpsB$ -Mutante

(A) Domänenarchitektur des bi-funktionellen Penicillin-bindenden Proteins PBP A1. Mutationen, die zu einem Funktionsverlust der Transglykosylase- bzw. der Transpeptidase-Domäne führen, sind angegeben (Zawadzka-Skomial *et al.*, 2006, Jeong *et al.*, 2013). (B) Einfluss der Expression von *pbpA1*-*flag* auf das Wachstum der $\Delta gpsB$ -Mutante. Die Stämme EGD-e (wt), LMJR19 ($\Delta gpsB$), LMS57 ($\Delta pbpA1$), LMJR38 ($\Delta gpsB \Delta pbpA1$) und LMJR60 ($\Delta gpsB \Delta pbpA1$ pIMK3-*pbpA1*-*flag*) wurden in BHI-Medium \pm 1 mM IPTG bei 37°C kultiviert. (C) Wachstum von $\Delta gpsB \Delta pbpA1$ -Mutanten, die mutierte Varianten von *pbpA1*-*flag* exprimieren. Die Mutationen befinden sich entweder in der Transglykosylase-Domäne (LMJR58, F120A; LMJR61, S149A T150A) oder der Transpeptidase-Domäne (LMJR59, S446A; LMJR62, S390A; LMJR63, T571A). Die Stämme wurden in BHI-Medium ohne IPTG vorkultiviert und zum Animpfen von Kulturen verwendet, die 1 mM IPTG enthielten. Das Wachstum wurde durch 15-minütige Messungen der optischen Dichte in einem Mikroplatten-Reader verfolgt. Die Stämme EGD-e (wt), LMJR19 ($\Delta gpsB$) und LMJR60 ($\Delta gpsB \Delta pbpA1$ pIMK3-*pbpA1*-*flag*) wurden als Kontrollen mitgeführt.

3.7. Komplementationsstudien zur Identifizierung funktioneller Aminosäuren in GpsB

Die Kristallstruktur des N- und C-Terminus von *L. monocytogenes* GpsB wurde durch die Kooperationspartner Prof. Dr. Richard J. Lewis und Dr. Robert M. Cleverley (Newcastle University) aufgelöst (Rismondo *et al.*, 2015a). Um den Beitrag mutmaßlich strukturell

relevanter Aminosäuren zur Funktion von GpsB zu untersuchen, wurden Komplementationsstudien durchgeführt. Der N-Terminus bildet eine Furche bestehend aus den konservierten Aminosäuren L16, E19, K21, T22, Y27, S28, E30, D31, D33, E34, L36, D37 und I40, die vorrangig negativ geladenen sind (Daten nicht gezeigt). Diese Struktur könnte möglicherweise an Interaktionen mit positiv-geladenen Bereichen der Interaktionspartner von GpsB, wie beispielsweise PBP A1, beteiligt sein. In unmittelbarer Nähe der Aminosäure V32, die an der Dimerisierung von GpsB beteiligt ist (Stephanie Großhennig, persönliche Mitteilung), befindet sich L36A. Diese Aminosäure könnte auch für die Dimerbildung von GpsB verantwortlich sein. Zur Identifizierung funktionell relevanter Aminosäuren wurden die Aminosäuren L24, R25, Y27, V32, D33, L36, D37 und I40 gegen Alanin ausgetauscht und der Einfluss der Expression dieser GpsB-Varianten auf das Wachstum der $\Delta gpsB$ -Mutante bei 42°C untersucht. Der Austausch der Aminosäuren Y27, V32, D33 und L36 zu Alanin resultierte in der Inaktivität dieser GpsB-Proteine (Abb. 25A). Die Mutation der Aminosäuren L24 und R25, die an der Membranbindung beteiligt sind (Abb. 6B), und der Aminosäuren D37 und I40, die in der beschriebenen Furche lokalisiert sind, führten zu intermediären Phänotypen (Abb. 25A). Die Aminosäuren D37 und I40 sind näher an der Oberfläche des GpsB-Proteins lokalisiert, wohingegen die Aminosäuren Y27, V32, D33 und L36 mehr ins Proteininnere gerichtet sind (Abb. 25C). Die Expression aller *gpsB*-Varianten konnte mittels Westernblot nachgewiesen werden. Ein DivIVA-Westernblot wurde zur Überprüfung der gleichmäßigen Beladung mitgeführt (Abb. 25B). Da die Mutation der Aminosäuren, die an der Dimerisierung von GpsB beteiligt sind (V32 und L36) und die Aminosäuren, die für die PBP A1-Bindung essenziell sind (Y27, D33, D37 und I40, Dr. Sven Halbedel, persönliche Mitteilung) zu einer starken Beeinträchtigung der Aktivität von GpsB führte, scheinen die Dimerisierung von GpsB und die Interaktion mit PBP A1 essenzielle Bedingungen für die Funktionalität von GpsB zu sein.

Die C-terminalen Aminosäuren R83 und E88 des GpsB aus *B. subtilis*, die in *LmGpsB* R96 und E101 entsprechen, bilden eine Salzbrücke, die möglicherweise zur Stabilisierung des Hexamers beiträgt (Rismondo *et al.*, 2015a). Die Expression von *gpsBR96A* und *gpsBE101A* in der $\Delta gpsB$ -Mutante, die mit Hilfe eines Westernblots nachgewiesen werden konnte (Abb. 25E), konnte den Wachstumsdefekt bei 42°C nicht komplementieren (Abb. 25D). Beide GpsB-Varianten wurden als Strep-tag-Fusionsproteine aufgereinigt und in einer Blue-Native PAGE analysiert (Abb. 25F, bereitgestellt von Dr. Sven Halbedel). Während GpsB-Strep ein Molekulargewicht von ca. 66 kDa aufwies, liefen die Proteine GpsB R96A-Strep und GpsB E101A-Strep bei ca. 40 kDa (Abb. 25F, Dr. Sven Halbedel, persönliche Mitteilung). Die

Deletion des C-Terminus von *gpsB* (GpsB¹⁻⁸⁹-Strep) führte nur zur Bildung eines Dimeres mit einem Molekulargewicht von ca. 30 kDa (Abb. 25F). Die Mutation der beiden Aminosäuren, R96A und E101A, verhinderte somit die Trimerisierung des C-Terminus und damit die Hexamerbildung, die essenziell für die Funktionalität von GpsB ist.

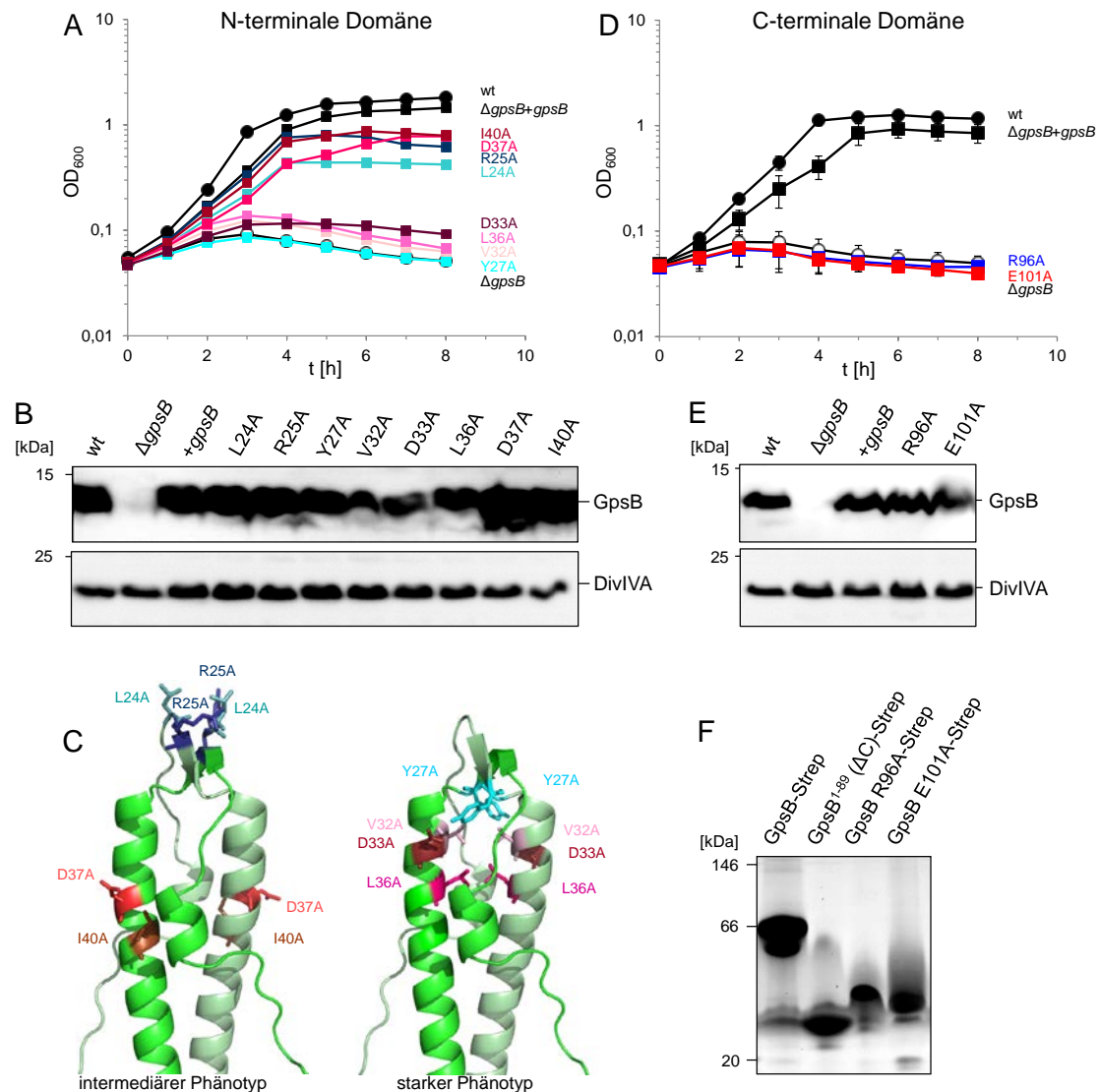


Abb. 25: Komplementationsstudien zur Identifizierung funktionell relevanter Aminosäuren in GpsB

(A) Einfluss von Mutationen im N-Terminus auf das Wachstum der *ΔgpsB*-Mutante. Die Stämme LMS56 (*ΔgpsB*+*gpsB*), LMJR68 (*ΔgpsB*+*gpsBL24A*), LMJR4 (*ΔgpsB*+*gpsBR25A*), LMJR130 (*ΔgpsB*+*gpsBY27A*), LMJR131 (*ΔgpsB*+*gpsBV32A*), LMJR132 (*ΔgpsB*+*gpsBL36A*), LMJR133 (*ΔgpsB*+*gpsBD37A*), LMJR134 (*ΔgpsB*+*gpsBI40A*) und LMJR135 (*ΔgpsB*+*gpsBD33A*) wurden in Anwesenheit von 1 mM IPTG bei 42°C in BHI-Medium inkubiert und die optische Dichte ($\lambda=600$ nm) stündlich bestimmt. EGD-e (wt) und LMJR19 (*ΔgpsB*) wurden als Kontrolle mitgeführt. (B) Westernblot zur Überprüfung der *gpsB*-Expression der Stämme aus (A) nach Wachstum bei 37°C. Die Detektion von DivIVA diente als Ladekontrolle. (C) Darstellung der N-terminalen Mutationen in der Kristallstruktur von GpsB. (D) Einfluss C-terminaler Mutationen auf das Wachstum der *ΔgpsB*-Mutante. Die Stämme EGD-e (wt), LMJR19 (*ΔgpsB*), LMS56 (*ΔgpsB*+*gpsB*), LMJR163 (*ΔgpsB*+*gpsBL24A*) und LMJR164 (*ΔgpsB*+*gpsBR25A*) wurden wie unter (A) beschrieben bei 42°C angezogen. (E) Westernblot zur Überprüfung der *gpsB*-Expression der Stämme aus (D) nach Wachstum bei 37°C. Die Detektion von DivIVA diente als Ladekontrolle. (F) Blue-Native PAGE zur Untersuchung der Oligomerisierung von GpsB-Strep, GpsB¹⁻⁸⁹-Strep, GpsB R96A-Strep und GpsB E101A-Strep. Abbildung zur Verfügung gestellt von Dr. Sven Halbedel.

3.8. Analyse von $\Delta gpsB$ -Suppressoren

3.8.1. Identifikation von $\Delta gpsB$ -Suppressormutationen

Das Isolieren und Analysieren von Suppressoren bietet eine gute Möglichkeit, funktionelle Zusammenhänge zwischen einem betrachteten Gen und anderen Genen aufzuklären und dessen Interaktionspartner zu identifizieren (Prelich, 1999). Die Deletion von *gpsB* führte dazu, dass *L. monocytogenes* nicht mehr bei 42°C wachsen kann. Nach einer eintägigen Inkubation einer BHI-Platte, die mit dem Stamm LMJR19 ($\Delta gpsB$) beimpft wurde, war kein Wachstum dieses Stammes zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Nach weiterer Inkubation bei 42°C bildete die $\Delta gpsB$ -Mutante spontane Suppressoren (Abb. 26). Für weitere Analysen wurden 13 Suppressoren isoliert und als *shg1-13* (*suppression of heat sensitivity of $\Delta gpsB$*) bezeichnet.



Abb. 26: Bildung von Suppressorkolonien bei Wachstum bei 42°C

Der Wildtypstamm EGD-e (wt) und LMJR19 ($\Delta gpsB$) wurden auf BHI-Platten ausgestrichen und für 2 Tage bei 42°C inkubiert. Die $\Delta gpsB$ -Mutante bildet unter diesen Bedingungen spontane Suppressoren (Pfeile).

Die Position der Suppressormutationen wurde durch Genomsequenzierung unter Verwendung des MiSeq-Systems (Illumina) identifiziert. Dazu wurden die erhaltenen Sequenzrohdaten gegen das Referenzgenom des Wildtypstammes EGD-e gemappt (Glaser *et al.*, 2001). Dabei konnten Mutationen in den Genen *murZ* (*lmo2552*), *clpC* (*lmo0232*), *lmo1549*, *lmo1921* und *lmo2550* nachgewiesen werden (Tab. 17). *clpC* (*lmo0232*) codiert für die ATPase-Untereinheit der Clp-Protease und *murZ* (*lmo2552*) für eine der beiden UDP-N-Acetylglucosamin 1-Carboxyvinyltransferasen, die *L. monocytogenes* besitzt. Die Suppressoren *shg4* ($\Delta gpsB$ *clpCR254A*), *shg5* ($\Delta gpsB$ *clpCR254A* *lmo1549L44A*), *shg6* ($\Delta gpsB$ *lmo2550E38G* *murZK23E*) und *shg8* ($\Delta gpsB$ *lmo1921H87Y*) wiesen Punktmutation in den Genen *clpC*, *murZ*, *lmo1549*, *lmo1921* bzw. *lmo2550* auf, die zu einem Aminosäureaustausch führten. Bei den Suppressoren *shg9* ($\Delta gpsB$ *murZ*¹⁻²⁵³), *shg10* ($\Delta gpsB$ *lmo1921*¹⁻⁷⁴), *shg11* ($\Delta gpsB$ *lmo1921*¹⁻⁷⁴) und *shg13* ($\Delta gpsB$ *lmo1921*¹⁻⁷⁴) führte eine Punktmutation zur Bildung des Stopp-Codon TAA, wodurch die Proteine MurZ und

Lmo1921 in diesen Suppressoren trunkiert sind. Im Gegensatz dazu kam es in Suppressor *shg7* ($\Delta gpsB$ *murZ*¹⁻⁹⁹) zur Insertion von zwei Basenpaaren in das Codon der Aminosäure 101 von *murZ*. Aufgrund des dadurch resultierenden Frameshifts wird auch in diesem Stamm ein trunkiertes MurZ synthetisiert. Dieses Protein, MurZ¹⁻⁹⁹, besteht aus 99 Aminosäuren, die der MurZ-Sequenz entsprechen, gefolgt von 41 Aminosäuren, die von der MurZ-Sequenz abweichen. Die Kristallstruktur von MurA aus *E. coli* und *L. monocytogenes* zeigt, dass MurA zwei globuläre Domänen bildet, die über einen Linker verbunden sind. Das aktive Zentrum von MurA befindet sich zwischen diesen beiden Domänen (Skarzynski *et al.*, 1996, Halavati *et al.*, unpublished). Da MurA und MurZ die gleiche Funktion ausüben, ist davon auszugehen, dass MurZ eine ähnliche Struktur ausbildet. In den Proteinen MurZ¹⁻²⁵³ und MurZ¹⁻⁹⁹ ist lediglich eine der beiden globulären Domänen vollständig bzw. nur zum Teil vorhanden und die Aktivität der Proteine dadurch vermutlich eingeschränkt. In Suppressor *shg12* ($\Delta gpsB$ *lmo1503*^{RBS}) wurde eine Punktmutation in der Ribosomen-Bindestelle von *lmo1503* identifiziert. Für die Stämme *shg1-3* konnten keine Mutationen gefunden werden, daher wurden sie nicht weiter betrachtet.

Tab. 17: Suppressormutationen der Stämme *shg1-13*

Suppressor	Mutation 1 ¹	Mutation 2 ¹
<i>shg1</i>	?	
<i>shg2</i>	?	
<i>shg3</i>	?	
<i>shg4</i>	<i>clpCR254S</i>	
<i>shg5</i>	<i>clpCR254S</i>	<i>lmo1549L44S</i>
<i>shg6</i>	<i>lmo2550E38G</i>	<i>murZK23E</i>
<i>shg7</i>	<i>murZ</i> ¹⁻⁹⁹	
<i>shg8</i>	<i>lmo1921H87Y</i>	
<i>shg9</i>	<i>murZ</i> ¹⁻²⁵³	
<i>shg10</i>	<i>lmo1921</i> ¹⁻⁷⁴	
<i>shg11</i>	<i>lmo1921</i> ¹⁻⁷⁴	
<i>shg12</i>	<i>lmo1503</i> ^{RBS}	
<i>shg13</i>	<i>lmo1921</i> ¹⁻⁷⁴	

¹ die Aminosäurepositionen der Mutationen sind jeweils angegeben

Zur Quantifizierung des Suppressionsgrades wurden die Wachstumseigenschaften und die Lysozymresistenz der Suppressoren bestimmt. Alle Suppressorstämme wiesen ein mit dem Wildtypstamm vergleichbares Wachstum bei 37°C auf (Daten nicht gezeigt). Auch der Wachstumsdefekt der $\Delta gpsB$ -Mutante bei 42°C wurde durch die Suppressormutationen

nahezu vollständig supprimiert (Abb. 27B). Weiterhin führten die Mutationen in den Suppressoren zu einem Verlust der erhöhten Lysozymresistenz im Vergleich zur unsupprimierten $\Delta gpsB$ -Mutante, welche jetzt dem Wildtyp-Niveau entspricht. Eine Ausnahme bildete *shg6* ($\Delta gpsB$ *lmo2550E38G* *murZK23E*), der eine immer noch leicht erhöhte Resistenz gegenüber Lysozym im Vergleich zum Wildtypstamm aufwies (Abb. 27C-D).

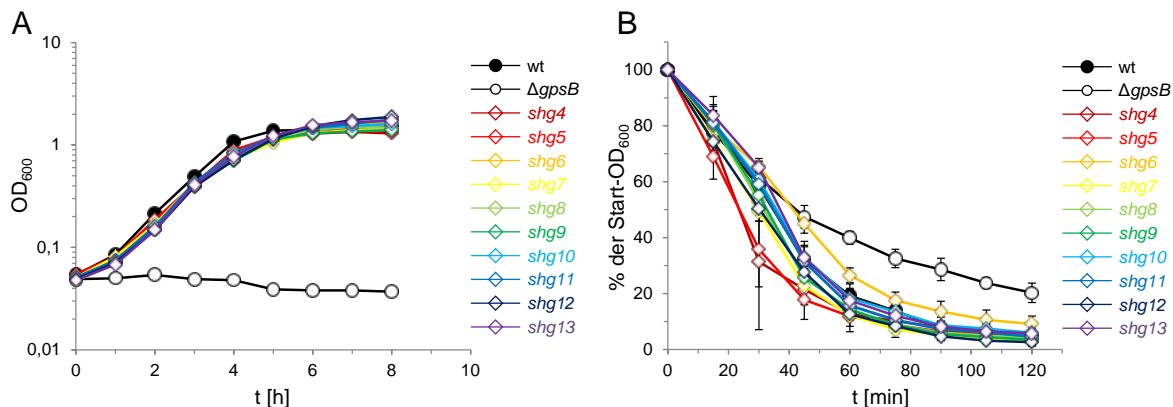


Abb. 27: Suppression des $\Delta gpsB$ -Phänotyps in den *shg*-Stämmen

(A) Die *L. monocytogenes*-Stämme EGD-e (wt), LMJR19 ($\Delta gpsB$) und *shg4-13* wurden in BHI-Medium bei 42°C kultiviert und die optische Dichte ($\lambda=600$ nm) stündlich gemessen. (B) Bestimmung der Lysozym-induzierten Autolyse der Suppressoren der $\Delta gpsB$ -Mutante. Die Stämme aus (A) wurden in BHI-Medium bei 37°C bis zu einer $OD_{600} \approx 0,8$ angezogen. Nach dem die Zellen gewaschen und in 50 mM Tris-HCl-Puffer pH8,0 resuspendiert wurden, wurde die Kultur mit 2,5 $\mu\text{g/ml}$ Lysozym versetzt. Die Abnahme der optischen Dichte ($\lambda=600$ nm) wurde über die Zeit photometrisch bestimmt. Mittelwerte und Standardabweichungen ergeben sich aus den Werten von drei unabhängigen Experimenten.

Um zu überprüfen, ob die Expression der in den *shg*-Suppressoren mutierten Gene einen dominanten Einfluss auf das Wachstum der $\Delta gpsB$ -Mutante hat, wurden sie als ektopische, IPTG-induzierbare Kopien in das Chromosom des Stamms LMJR19 ($\Delta gpsB$) integriert. Die Expression von *lmo1921*¹⁻⁷⁴ führte zu einer starken Suppression des Wachstumsdefektes, die zusätzliche Expression von *lmo1549L44S*, *lmo1921H87Y*, *murZK23E* und *murZ*¹⁻²⁵³ äußerte sich hingegen in einem intermediären Phänotyp (Abb. 28A). Diese mutierten Allele sind somit dominant gegenüber ihrem jeweiligen Wildtyp-Allel. Der Wachstumsdefekt der $\Delta gpsB$ -Mutante konnte durch die Expression von *clpCR254S*, *murZ*¹⁻⁹⁹, *lmo1503* und *lmo2550E38G* hingegen nicht supprimiert werden (Abb. 28A). Zur Kontrolle wurden die Wildtyp-Allele von *lmo1549*, *lmo1921* und *murZ* ebenfalls in der $\Delta gpsB$ -Mutante exprimiert, was keinen supprimierenden Einfluss auf das Wachstum der $\Delta gpsB$ -Stämme LMJR105 ($\Delta gpsB+lmo1549$), LMJR106 ($\Delta gpsB+lmo1921$) und LMJR107 ($\Delta gpsB+murZ$) bei 42°C hatte (Abb. 28B). Interessant war jedoch, dass die Überexpression von *lmo1503* zur Steigerung des Wachstumsdefektes des $\Delta gpsB$ -Stammes LMJR96 ($\Delta gpsB+lmo1503$) bei

37°C führte. Die Überexpression von *lmo1503* im Wildtypstamm hatte hingegen keinen Einfluss auf das Wachstum von Stamm LMJR102 (wt+*lmo1503*) (Abb. 28C). Der Einfluss der Expression der *shg*-Gene auf das Wachstum der $\Delta gpsB$ -Mutante lässt sich somit in 4 Klassen unterteilen: Die Expression der *shg*-Gene führt zu einer nahezu vollständigen Suppression des Wachstumsdefektes der $\Delta gpsB$ -Mutante (*lmo1921*¹⁻⁷⁴), zu einer partiellen Suppression (*lmo1549L44S*, *lmo1921H87Y*, *murZK23E*, *murZ*¹⁻²⁵³), hatte keinen Einfluss auf das Wachstum der $\Delta gpsB$ -Mutante (*clpCR254S*, *murZ*¹⁻⁹⁹, *lmo2550E38G*) oder führte zur Steigerung des Wachstumsdefektes (*lmo1503*).

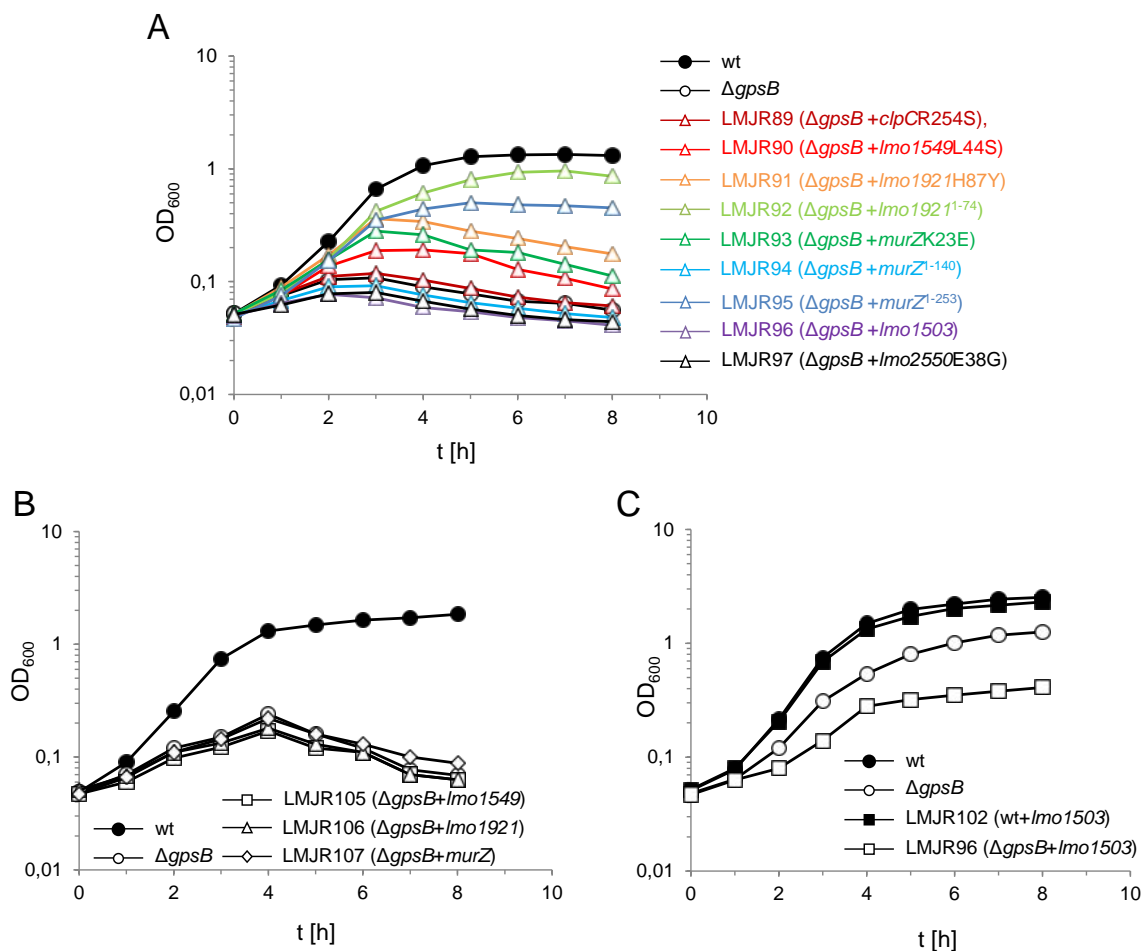


Abb. 28: Effekt der ektopischen Expression der *shg*-Gene auf das Wachstum von $\Delta gpsB$ -Stämmen

(A) Expression der *shg*-Gene in $\Delta gpsB$ -Stämmen. Die Stämme EGD-e (wt), LMJR19 ($\Delta gpsB$), LMJR89 ($\Delta gpsB$ + *clpCR254S*), LMJR90 ($\Delta gpsB$ + *lmo1549L44S*), LMJR91 ($\Delta gpsB$ + *lmo1921H87Y*), LMJR92 ($\Delta gpsB$ + *lmo1921*¹⁻⁷⁴), LMJR93 ($\Delta gpsB$ + *murZK23E*), LMJR94 ($\Delta gpsB$ + *murZ*¹⁻⁹⁹), LMJR95 ($\Delta gpsB$ + *murZ*¹⁻²⁵³), LMJR96 ($\Delta gpsB$ + *lmo1503*) und LMJR97 ($\Delta gpsB$ + *lmo2550E38G*) wurden in BHI-Medium, das bei den Stämmen LMJR89-97 mit 1 mM IPTG versetzt wurde, bei 42°C angezogen und die optische Dichte ($\lambda=600$ nm) stündlich bestimmt. (B) Expression der Wildtyp-Allele von *lmo1549*, *lmo1921* und *murZ* im $\Delta gpsB$ -Hintergrund. Das Wachstum der Stämme EGD-e (wt), LMJR19 ($\Delta gpsB$), LMJR105 ($\Delta gpsB$ + *lmo1549*), LMJR106 ($\Delta gpsB$ + *lmo1921*) und LMJR107 ($\Delta gpsB$ + *murZ*) wurde während der Kultivierung in BHI-Medium (+ 1 mM IPTG für LMJR105-107) bei 42°C dokumentiert. (C) Einfluss der ektopischen Expression von *lmo1503* auf das Wachstum von Wildtyp- und $\Delta gpsB$ -Stämmen. Die Stämme EGD-e (wt), LMJR19 ($\Delta gpsB$), LMJR102 (wt + *lmo1503*) und LMJR96 ($\Delta gpsB$ + *lmo1503*) wurden bei 37°C kultiviert und das Wachstum photometrisch verfolgt. Die Anzucht von LMJR102 und LMJR96 erfolgte in Anwesenheit von IPTG.

3.8.2. Suppression des $\Delta gpsB$ -Phänotyps durch Deletion von $murZ$

Die ektopische Expression der beiden Allele $murZK23E$ und $murZ^{1-253}$ supprimiert den Wachstumsdefekt der $\Delta gpsB$ -Mutante. Die Mutation K23E in MurA aus *Enterobacter cloacae* führte zu einer 0,5%-igen Aktivität des Proteins im Vergleich zum Wildtyp-MurA (Samland *et al.*, 1999). Sehr wahrscheinlich weist auch $MurZ^{1-253}$ eine reduzierte oder sogar keine Aktivität auf, da eine der kugelförmigen Domänen fehlt und das aktive Zentrum von MurZ nicht mehr vollständig gebildet werden kann. Daher lag der Verdacht nahe, dass $MurZK23E$ und $MurZ^{1-253}$ mit dem Wildtypprotein interagieren und dessen Funktion unterdrücken. Demzufolge müsste die Deletion des $murZ$ -Gens ebenfalls zur Suppression des Wachstumsdefektes der $\Delta gpsB$ -Mutante führen. Der Wachstumsdefekt der $\Delta gpsB$ -Mutante konnte tatsächlich durch die zusätzliche Deletion von $murZ$ nahezu vollständig supprimiert werden (Stamm LMJR103, Abb. 29A). Die Deletion von $murZ$ im Wildtypstamm (LMJR104) hatte hingegen keinen Einfluss auf das Wachstum bei 42°C. Um zu überprüfen, ob die Deletion von $murZ$ auch den Zellteilungsdefekt der $\Delta gpsB$ -Mutante supprimiert, wurde die Zelllänge der $\Delta murZ$ -Deletionsstämme bestimmt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Deletion von $murZ$ zu einer Verlängerung der Zellen im Vergleich zum Wildtypstamm führte (LMJR104, $1,37 \pm 0,4 \mu m$, wt, $1,21 \pm 0,22 \mu m$), die jedoch vergleichbar mit der Zelllänge des Stammes LMJR19 ($\Delta gpsB$, $1,43 \pm 0,6 \mu m$) ist. Die Deletion von $murZ$ in der $\Delta gpsB$ -Mutante führte zu keiner zusätzlichen Veränderung (LMJR103, $1,4 \pm 0,3 \mu m$, Abb. 29B).

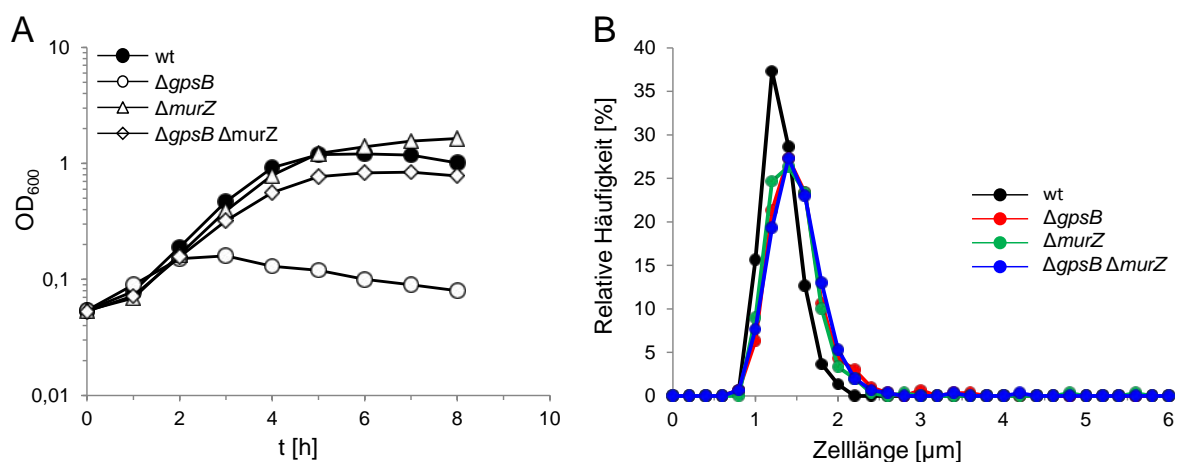


Abb. 29: Einfluss der Deletion von $murZ$ auf Wachstum und Zelllänge

(A) Wachstum der *L. monocytogenes* $\Delta murZ$ - und $\Delta gpsB \Delta murZ$ -Mutante. Die Stämme EGD-e (wt), LMJR19 ($\Delta gpsB$), LMJR104 ($\Delta murZ$) und LMJR103 ($\Delta gpsB \Delta murZ$) wurden in BHI-Medium bei 42°C angezogen und die optische Dichte ($\lambda=600$ nm) stündlich gemessen. (B) Zelllängenverteilung der Stämme aus (A) nach einer Inkubation bei 37°C bis zur mittleren logarithmischen Wachstumsphase. Von jedem Stamm wurde die Zelllänge von 300 Zellen bestimmt.

3.8.3. Die MurA-Mengen beeinflussen den *AgpsB*-Phänotyp

Die zweite UDP-N-Acetylglucosamin 1-Carboxyvinyltransferase aus *L. monocytogenes*, MurA, wird durch das Gen *lmo2526* codiert. Um zu überprüfen, ob MurA ebenfalls einen Einfluss auf das Wachstum der *AgpsB*-Mutante hat, sollte eine Δ *murA*-Deletionsmutante hergestellt werden. Mehrere Versuche, das *murA*-Gen zu deletieren, scheiterten, weshalb vermutet wurde, dass es sich um ein essenzielles Gen in *L. monocytogenes* handelt. Aufgrund dessen wurde ein Stamm hergestellt, der eine ektopische, IPTG-induzierbare Kopie von *murA* aufwies. In diesem Stamm konnte das chromosomal codierte *murA*-Gen (*lmo2526*) deletiert werden. Um den Einfluss der MurA-Depletion auf das Wachstum der *AgpsB*-Mutante zu testen, wurden IPTG-haltige Vorkulturen der MurA-Depletionsstämme (LMJR122 – *ImurA AgpsB* und LMJR123 – *ImurA*) verwendet, um frische Kulturen, die kein IPTG enthielten, anzupflanzen. Dabei zeigte sich, dass das Wachstum des Stammes LMJR123 (*ImurA*) in Abwesenheit von IPTG im Vergleich zum Wildtypstamm bei 37°C verlangsamt ist. Die Depletion von MurA im Stamm LMJR122 (*ImurA AgpsB*) verhinderte jedoch das Wachstum bei 37°C nahezu vollständig (Abb. 30A). Die *AgpsB*-Mutante ist somit besonders sensitiv gegenüber der Depletion von MurA, was auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen beiden Proteinen hinweist. Bei 42°C hingegen konnten beide MurA-Depletionsstämme nicht in Abwesenheit von IPTG wachsen (Abb. 30A-B).

Da MurA durch Fosfomycin inhibiert werden kann (Kim *et al.*, 1996, De Smet *et al.*, 1999, Eschenburg *et al.*, 2005), wurde die Fosfomycinresistenz vom Wildtypstamm und des Stammes LMJR19 (*AgpsB*) bestimmt. Die im Vergleich zum Wildtypstamm erhöhte Sensitivität der *AgpsB*-Mutante gegenüber Fosfomycin deckte sich mit der erhöhten Sensitivität gegenüber der MurA-Depletion (Abb. 30A+C).

Interessanterweise führte die Anwesenheit von IPTG im Stamm LMJR122 (*ImurA AgpsB*) zu einer partiellen Suppression des Wachstumsdefektes bei 37°C und 42°C (Abb. 30A-B). Die Induktion des P_{help} -Promotors mit 1 mM IPTG führt in der Regel zur Überexpression der nachgeschalteten Gene. Um zu überprüfen, ob in Anwesenheit von IPTG tatsächlich eine *murA*-Überexpression vorliegt, wurden Westernblot-Analysen unter Verwendung von MurAA-Antikörpern durchgeführt. MurAA ist das MurA-Homolog in *B. subtilis*, das eine Identität von 72% gegenüber MurA aus *L. monocytogenes* aufweist, wodurch die Verwendung des MurAA-spezifischen Antikörpers möglich war. Die Westernblots zeigen, dass in Abwesenheit von IPTG kein MurA in den Stämmen LMJR122 (*ImurA AgpsB*) und LMJR123 (*ImurA*) nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz dazu sind die MurA-Mengen unter Induktionsbedingungen bei den Stämmen LMJR122 (*ImurA AgpsB*) und LMJR123

(*ImurA*) deutlich höher als im Wildtypstamm und der Δ *gpsB*-Mutante (Abb. 30D). Die Überexpression von *murA* im Stamm LMJR122 (*ImurA* Δ *gpsB*) scheint somit zur Suppression des Wachstumsdefektes der Δ *gpsB*-Mutante zu führen.

Um zu testen, ob die alleinige Überexpression von *murA* für die Suppression des Wachstumsdefektes der Δ *gpsB*-Mutante ausreichend ist, wurde eine zweite, IPTG-induzierbare *murA*-Kopie in die Δ *gpsB*-Mutante eingebracht (Stamm LMJR117, Δ *gpsB*+*murA*). In Abwesenheit von IPTG wies der Stamm die Wachstumscharakteristika der Δ *gpsB*-Mutante bei 37°C und 42°C auf. Die Induktion der *murA*-Expression führte hingegen zu einer partiellen Suppression des Wachstumsdefektes (Abb. A8A-B). Im Gegensatz dazu hatte die Überexpression von *murA* keinen Einfluss auf das Wachstum des Wildtypstammes (LMJR116, Abb. A8A-B) und die IPTG-abhängige Expression von *murA* konnte mittels Westernblot nachgewiesen werden (Abb. A8C). Dies lässt vermuten, dass die Erhöhung der MurA-Menge den hitzesensitiven Δ *gpsB*-Phänotyp aufhebt.

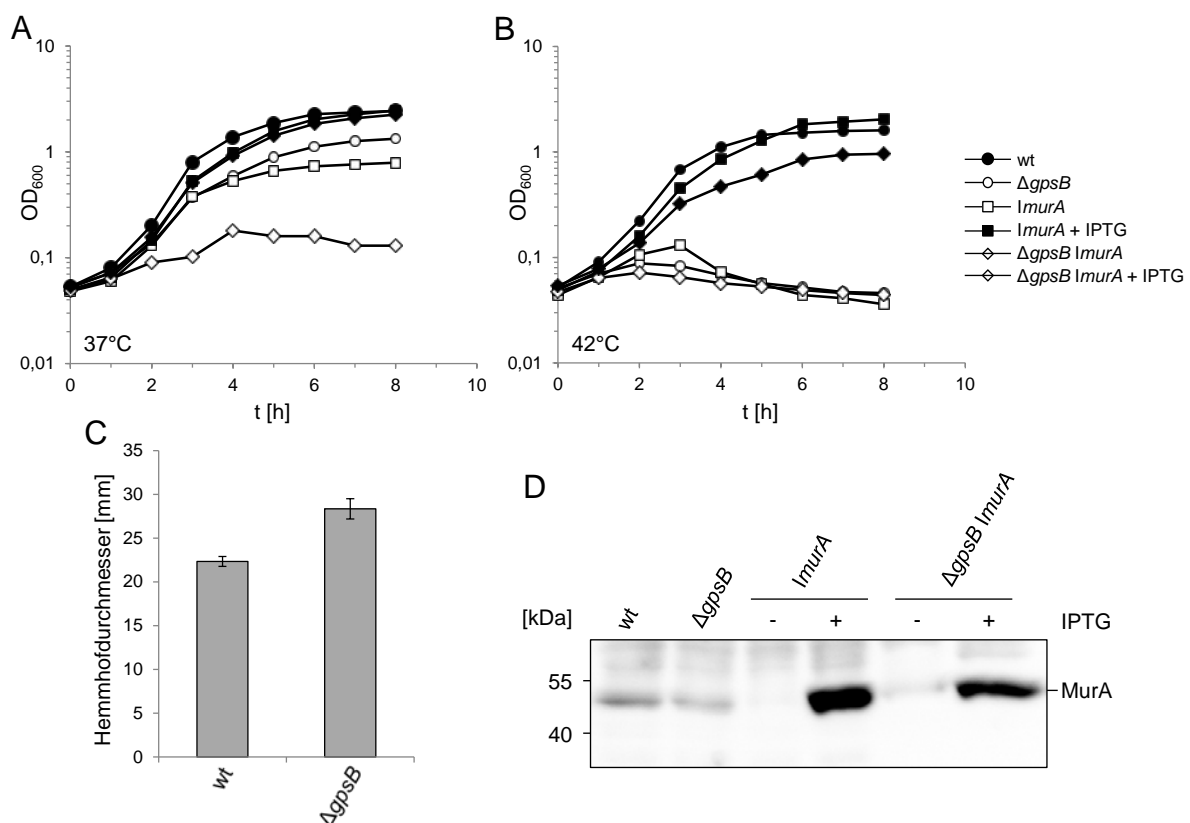


Abb. 30: Erhöhte Sensitivität der Δ *gpsB*-Mutante gegenüber der Inaktivierung von *murA*

(A-B) Die Stämme EGD-e (wt), LMJR19 (Δ *gpsB*), LMJR123 (*ImurA*) und LMJR122 (*ImurA* Δ *gpsB*) wurden in BHI-Medium \pm 1 mM IPTG bei 37°C (A) oder 42°C (B) angezogen und die optische Dichte ($\lambda=600$ nm) stündlich bestimmt. (C) Erhöhte Fosfomycinsensitivität der Δ *gpsB*-Mutante. Mit Fosfomycin (10 mg/ml) versetztes Filterpapier wurde auf die Oberfläche einer BHI-Agarplatte gelegt, die vorher mit EGD-e (wt) und LMJR19 (Δ *gpsB*) beimpft wurde. Mittelwerte und Standardabweichungen des Hemmhofdurchmessers ergeben sich aus drei unabhängigen Experimenten. (D) Westernblot zum Nachweis der IPTG-abhängigen Expression von *murA*. Die Stämme aus (A) wurden in BHI-Medium \pm 1 mM IPTG bei 37°C bis zu einer $OD_{600}=1$ kultiviert, Proteinextrakte isoliert und im Westernblot unter Verwendung eines MurAA-spezifischen polyklonalen Antikörpers (MurAA aus *Bacillus subtilis*) analysiert.

3.8.4. Suppression des $\Delta gpsB$ -Phänotyps durch Deletion von $clpC$

Da *B. subtilis* MurAA ein Substrat der ClpCP-Protease ist (Kock *et al.*, 2004), könnte MurA aus *L. monocytogenes* ebenfalls ein Substrat dieser Protease sein. In diesem Fall müsste die Deletion von *clpC* zu einer erhöhten MurA-Proteinmenge führen und dadurch den Wachstumsdefekt der $\Delta gpsB$ -Mutante supprimieren. Um dies zu überprüfen, wurde das *clpC*-Gen (*lmo0232*) im Wildtypstamm (LMJR138, $\Delta clpC$) und in der $\Delta gpsB$ -Mutante (LMJR139, $\Delta clpC \Delta gpsB$) deletiert. Die Deletion von *clpC* führte wie vermutet zu einer nahezu vollständigen Suppression des hitzesensitiven Phänotyps der $\Delta gpsB$ -Mutante und resultierte in einem zur $\Delta clpC$ -Einzelmutante vergleichbaren Wachstum (Abb. 31A). Zudem wies der Stamm LMJR139 ($\Delta clpC \Delta gpsB$) eine zum Wildtypstamm und zur $\Delta clpC$ -Einzelmutante vergleichbare Zelllänge auf (Abb. 31B). Dies unterstützt die Vermutung, dass MurA ein Substrat von ClpCP ist und die daraus resultierende Akkumulation in der $\Delta clpC \Delta gpsB$ -Deletionsmutante (LMJR139) zur Suppression des $\Delta gpsB$ -Phänotyps führt.

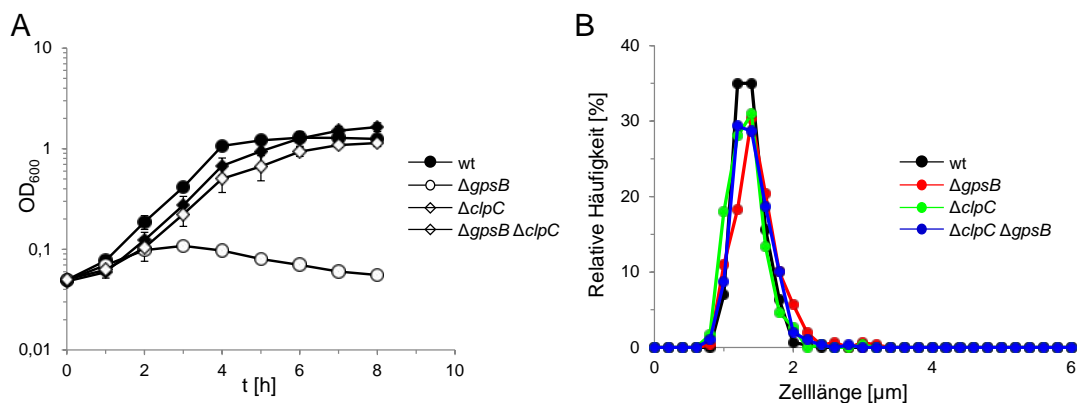


Abb. 31: Einfluss der Deletion von $clpC$ auf das Wachstum der $\Delta gpsB$ -Mutante bei 42°C

(A) Die Stämme EGD-e (wt), LMJR19 ($\Delta gpsB$), LMJR138 ($\Delta clpC$) und LMJR139 ($\Delta gpsB \Delta clpC$) wurden in BHI-Medium bei 42°C angezogen und die optische Dichte ($\lambda=600$ nm) stündlich gemessen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Messungen ermittelt. (B) Zelllängenverteilung der Stämme aus (A) nach Wachstum bei 37°C bis zur mittleren logarithmischen Wachstumsphase. Zum Vergleich der Zelllänge wurden von jedem Stamm 300 Zellen ausgemessen.

3.8.5. Erhöhte MurA-Mengen in den *shg*-Suppressoren

Da die Überexpression von *murA* zur Suppression des Wachstumsdefektes der $\Delta gpsB$ -Mutante führte, wurden die MurA-Proteinmengen in den Suppressoren *shg4-13* mittels Westernblot überprüft. Dabei konnte gezeigt werden, dass *murA* in den Suppressoren im Vergleich zum Wildtypstamm und der $\Delta gpsB$ -Mutante überexprimiert ist (Abb. 32). Somit scheint die Suppression der Hitzesensitivität in den Suppressorstämmen ebenfalls durch erhöhte MurA-Mengen bedingt zu sein.

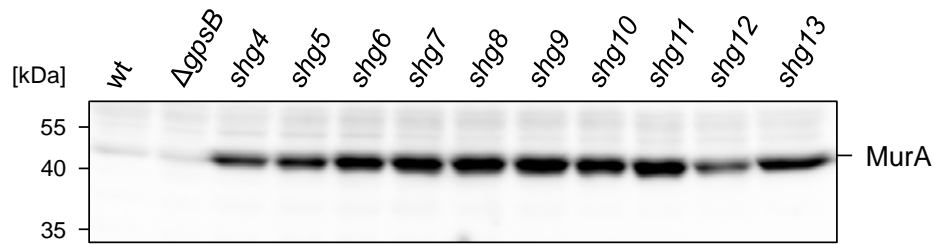


Abb. 32: Die *shg*-Suppressoren weisen eine erhöhte MurA-Proteinmenge auf

Die Stämme EGD-e (wt), LMJR19 ($\Delta gpsB$) und die Suppressoren *shg4-13* wurden in BHI-Medium bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von $OD_{600}=1$ angezogen, die zellulären Proteine isoliert und anschließend in einer 12,5%-igen SDS-PAGE aufgetrennt. Zur Detektion von MurA wurde ein MurAA-spezifischer polyklonaler Antikörper verwendet (oben).

3.8.6. Die *murA*-Transkriptmengen sind unverändert

Westernblot-Analysen mit den $\Delta murZ$ - und $\Delta clpC$ -Deletionsmutanten LMJR103 ($\Delta murZ \Delta gpsB$), LMJR104 ($\Delta murZ$), LMJR138 ($\Delta clpC$) und LMJR139 ($\Delta clpC \Delta gpsB$) zeigten, dass in diesen Stämmen auch mehr MurA vorhanden ist als im Wildtypstamm (Abb. 33A). Die Deletion von *clpC* führte hierbei zur Akkumulation von MurA, da die ClpCP-Protease, die mutmaßlich für den Abbau von MurA verantwortlich ist, nicht vorhanden ist. Scheinbar kann die Funktion auch nicht von den anderen Clp-ATPasen ClpB (Chastanet *et al.*, 2004) und ClpE (Nair *et al.*, 1999) übernommen werden. Warum die MurA-Menge in der $\Delta murZ$ -Mutante erhöht ist, bleibt jedoch unklar. Dies könnte ebenfalls durch den verringerten Abbau durch ClpCP oder auch durch die erhöhte Transkription/Translation des *murA*-Genes bedingt sein. Um dieser Frage nachzugehen, wurde die RNA ausgewählter *shg*-Stämme isoliert und ein Northernblot unter Verwendung einer *murA*-spezifischen RNA-Sonde durchgeführt. Zur Herstellung der RNA-Sonde wurde ein Teil der *murA*-Genregion (ca. 800 bp des 1,4 kb-Transkripts, Abb. 33C) mittels PCR amplifiziert, in RNA umgeschrieben und anschließend zur Hybridisierung des Northernblots verwendet. Der Northernblot zeigte, dass die Menge des *murA*-Transkriptes in den Suppressoren *shg4* ($\Delta gpsB clpCR254S$), *shg7* ($\Delta gpsB murZ^{1-99}$) und *shg9* ($\Delta gpsB murZ^{1-253}$) vergleichbar mit dem Wildtypstamm ist. Auch in den Deletionsmutanten LMJR19 ($\Delta gpsB$), LMJR103 ($\Delta gpsB \Delta murZ$), LMJR104 ($\Delta murZ$), LMJR138 ($\Delta clpC$) und LMJR139 ($\Delta gpsB \Delta clpC$) ist die Menge des *murA*-Transkriptes gegenüber dem Wildtypstamm nicht verändert. Weiterhin konnte eine IPTG-abhängige Transkription des *murA*-Genes im MurA-Depletionsstamm LMJR123 (*ImurA*) nachgewiesen werden (Abb. 33B). Aufgrund dieser Ergebnisse ist zu vermuten, dass die Akkumulation von MurA in den hier untersuchten Stämmen nicht durch Induktion der *murA*-Transkription verursacht ist.

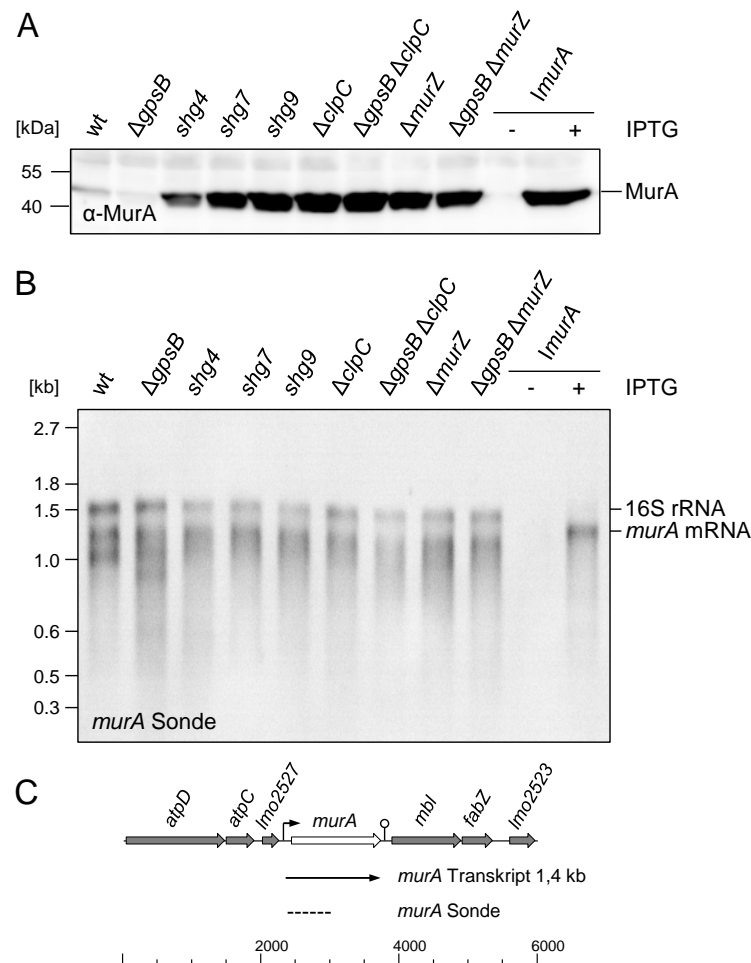


Abb. 33: Analyse der *murA*-Expression in ausgewählten *L. monocytogenes*-Stämmen

(A) Westernblot zur Detektion der MurA-Proteinmengen in *L. monocytogenes* $\Delta clpC$ -, $\Delta murZ$ - und $\Delta gpsB$ -Stämmen. Die Stämme EGD-e (wt), LMJR19 ($\Delta gpsB$), $shg4$ ($\Delta gpsB$ *clpCR254S*), $shg7$ ($\Delta gpsB$ *murZ*¹⁻⁹⁹), $shg9$ ($\Delta gpsB$ *murZ*¹⁻²⁵³), LMJR138 ($\Delta clpC$), LMJR139 ($\Delta gpsB$ $\Delta clpC$), LMJR104 ($\Delta murZ$), LMJR103 ($\Delta gpsB$ $\Delta murZ$) und LMJR123 (*ImurA*) wurden in BHI-Medium bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von OD₆₀₀=1 angezogen, die zellulären Proteine isoliert und mit Hilfe eines Westernblots analysiert. Zur Detektion von MurA wurde ein MurAA-spezifischer polyklonaler Antikörper verwendet. (B) Northern-Blot zur Untersuchung der *murA*-Transkription. (C) Schematische Darstellung der *murA*-Genregion. Die Positionen des *murA*-Transkripts und der *murA*-Sonde sind eingezeichnet.

3.8.7. Suppression des $\Delta gpsB$ -Phänotyps durch Deletion von *lmo1503*, *lmo1549*, *lmo1921* und *lmo2550*

In den *shg*-Stämmen wurden neben den Mutationen in *murZ* und *clpC* auch Mutationen in den Genen *lmo1549*, *lmo1921* und *lmo2550* und in der Ribosomen-Bindestelle von *lmo1503* nachgewiesen. *Lmo1549* ist als DNA-Reparatur-Protein RadC annotiert. Der Locus, in dem sich das Gen befindet, deutet jedoch eher auf eine andere Funktion hin, da es vor dem *mreBCD*-Operon liegt. Die Proteine MreBCD sind für die Zellmorphologie stäbchenförmiger Bakterien von entscheidender Bedeutung. Das Aktin-ähnliche Protein MreB bildet hierbei perpendikulär verlaufende Strukturen aus, die als Gerüst für Proteine dienen, die an der lateralen Zellwandsynthese beteiligt sind (Jones *et al.*, 2001, Daniel und Errington, 2003,

Dominguez-Escobar *et al.*, 2011, Garner *et al.*, 2011, van Teeffelen *et al.*, 2011). Somit wäre es denkbar, dass Lmo1549 eine Funktion in der Zellteilung oder der Kontrolle der Zellmorphologie hat. *L. monocytogenes lmo2550* wird für die Beladung von Wandteichonsäuren mit N-Acetylglucosamin benötigt (Eugster *et al.*, 2011). Die Funktionen von *lmo1921* und dessen *B. subtilis*-Homolog *ypiB* sowie die Funktion von *lmo1503* sind bislang nicht bekannt. Da die Mutation von Genen eher zu einem Funktionsverlust als zu einem Funktionsgewinn führt, wurden $\Delta lmo1503$ -, $\Delta lmo1549$ -, $\Delta lmo1921$ - und $\Delta lmo2550$ -Deletionsmutanten hergestellt. Der Stamm LMJR121 ($\Delta lmo1921$) wies im Vergleich zum Wildtypstamm ein verlangsamtes Wachstum bei 42°C auf, aber durch die Deletion von *lmo1921* im $\Delta gpsB$ -Hintergrund konnte eine deutliche Suppression des Wachstumsdefektes der $\Delta gpsB$ -Mutante festgestellt werden (Abb. 34B). Interessanterweise wächst die $\Delta lmo1921$ $\Delta gpsB$ -Doppelmutante (LMJR120) sogar besser als die $\Delta lmo1921$ -Einzelmutante (LMJR121), beide Mutationen supprimieren sich also gegenseitig. Die Deletion von *lmo1503* in der $\Delta gpsB$ -Mutante (LMJ137) führte zu einer nahezu vollständigen Suppression des Wachstumsdefektes der $\Delta gpsB$ -Mutante bei 42°C (Abb. 34G). Die Suppression des Wachstumsdefektes der $\Delta gpsB$ -Mutante durch Deletion von *lmo1503* und die Steigerung des Wachstumsdefektes durch Überexpression von *lmo1503* deuten darauf hin, dass die Mutation in der Ribosomen-Bindestelle von *lmo1503* in Suppressor *shg12* ($\Delta gpsB$ *lmo1503*^{RBS}) zu einer verringerten Transkription von *lmo1503* führt. Die Deletion von *lmo1549* und *lmo2550* im $\Delta gpsB$ -Hintergrund resultierte nur in einem intermediären Phänotyp (Abb. 34A, E). Um herauszufinden, ob *lmo1549*, *lmo1921* und *lmo2550* Einfluss auf die Zellteilung haben, wurde die Zelllänge der Deletionsmutanten gemessen. Während die Deletion von *lmo1549* im Wildtyphintergrund (LMJR118) zu einer geringfügigen Zellverkürzung führte, führte die zusätzliche Deletion in der $\Delta gpsB$ -Mutante (LMJR119) zu einer deutlichen Zellverlängerung und einer Inhomogenität der Zelllängenverteilung (Abb. 34B). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Lmo1549 tatsächlich an Prozessen der Zellteilung beteiligt ist. Die Deletion von *lmo1921* und *lmo2550* im Wildtypstamm (LMJR121 und LMJR156) hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Zelllänge. Dahingegen wurde der Zellteilungsdefekt der $\Delta gpsB$ -Mutante durch die zusätzliche Deletion der beiden Gene supprimiert (Abb. 34D, F). Die Deletion von *lmo1503* im Wildtyphintergrund (LMJR136, $1,4 \pm 0,35$ μm , wt, $1,26 \pm 0,2$ μm) äußerte sich in einer Verlängerung der Zellen die vergleichbar mit dem Stamm ist, der eine Deletion von *gpsB* aufweist (LMJR19, $1,37 \pm 0,34$ μm) (Abb. 34H). Der Zellteilungsdefekt wird jedoch durch die gleichzeitige Deletion von *gpsB* und *lmo1503* im Stamm LMJR137 ($1,42 \pm 0,32$ μm) nicht verstärkt (Abb. 34H). Demnach haben GpsB und Lmo1503 vermutlich

Einfluss auf den gleichen Prozess, wohingegen GpsB und Lmo1549 Funktionen in verschiedenen Prozessen ausüben.

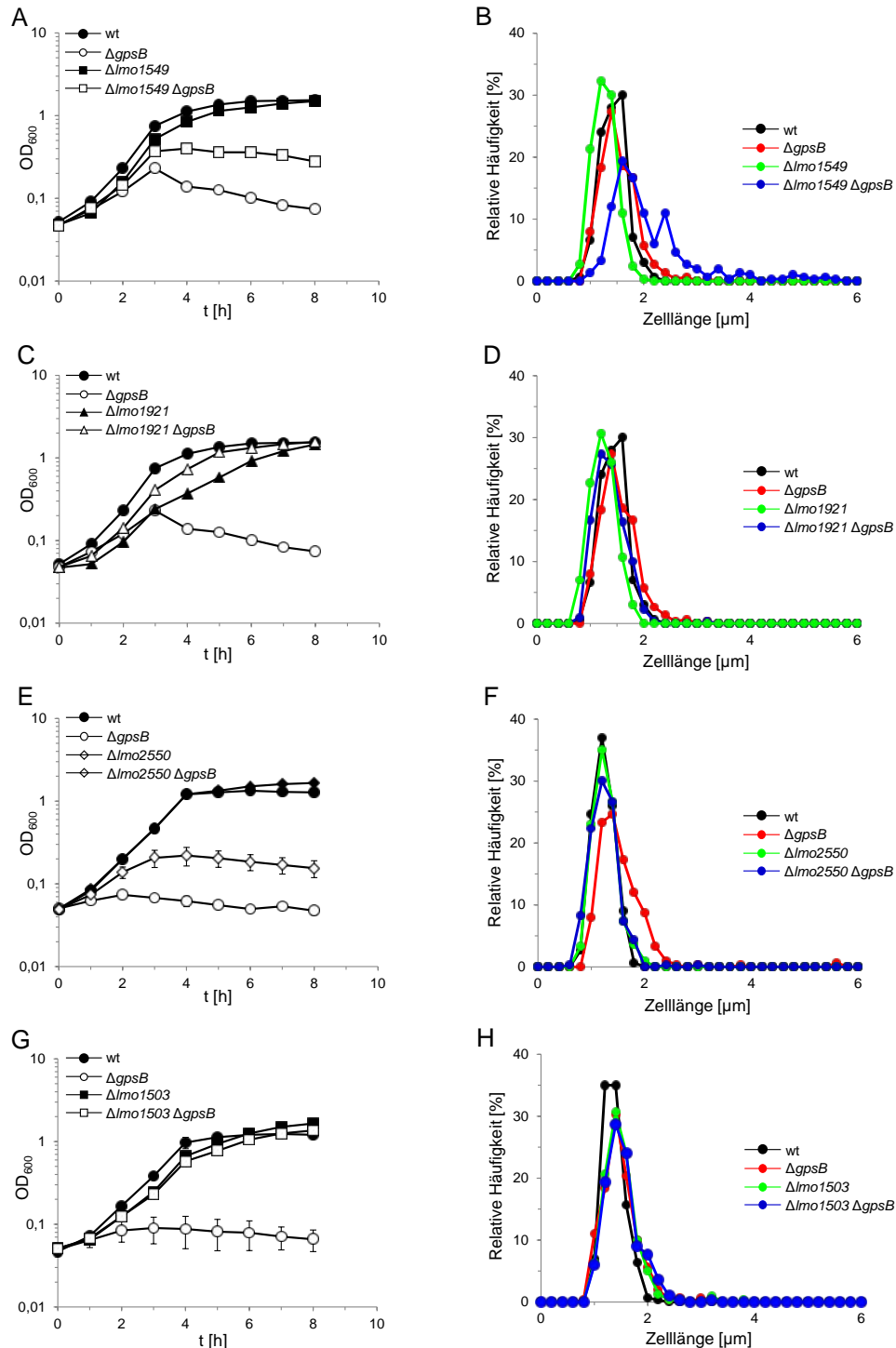


Abb. 34: Suppression des Δ *gpsB*-Phänotyps durch Deletion von *lmo1549*, *lmo1921*, *lmo2550* und *lmo1503*
(A,C,E,G) Die Stämme EGD-e (wt), LMJR19 (Δ *gpsB*), LMJR118 (Δ *lmo1549*), LMJR119 (Δ *lmo1549* Δ *gpsB*), LMJR120 (Δ *lmo1921* Δ *gpsB*), LMJR121 (Δ *lmo1921*), LMJR156 (Δ *lmo2550*), LMJR157 (Δ *lmo2550* Δ *gpsB*), LMJR136 (Δ *lmo1503*) und LMJR137 (Δ *lmo1503* Δ *gpsB*) wurden in BHI-Medium bei 42°C angezogen und die optische Dichte (λ =600 nm) stündlich bestimmt. (B,D,F,H) Zelllängenverteilung der Stämme aus (A,C,E,G) nach Wachstum bei 37°C bis zur mittleren logarithmischen Wachstumsphase. Zum Vergleich der Zelllänge wurden von jedem Stamm 300 Zellen ausgemessen.

3.8.8. Zwei Arten der Suppression des *AgpsB*-Phänotyps

Um zu überprüfen, ob die Suppression des Wachstumsdefektes der *AgpsB*-Mutante bei 42°C durch die zusätzliche Deletion von *lmo1549*, *lmo1921*, *lmo2550* sowie *lmo1503* MurA-abhängig ist, wurden Proteinextrakte der jeweiligen Einzel- und Doppelmутanten isoliert und mittels Westernblot analysiert. Als Kontrollen wurden die Suppressoren mitgeführt, bei denen Mutationen in den betroffenen Genen identifiziert wurden. Die Westernblots zeigten, dass die Deletion von *lmo1503* und *lmo1921* im Wildtyphintergrund und in der *AgpsB*-Mutante zu einer Akkumulation von MurA führte. Dahingegen waren die MurA-Mengen in den $\Delta lmo1549$ - und $\Delta lmo2550$ -Deletionsmutanten LMJR118 ($\Delta lmo1549$), LMJR119 ($\Delta lmo1549$ *AgpsB*), LMJR156 ($\Delta lmo2550$) und LMJR157 ($\Delta lmo2550$ *AgpsB*) vergleichbar mit dem Wildtypstamm (Abb. 35). In den Suppressoren *shg5* (*AgpsB clpCR254S lmo1549L44S*) und *shg6* (*AgpsB lmo2550E38G murZK23E*) wurden hingegen erhöhte MurA-Mengen nachgewiesen. In diesen beiden Suppressorstämmen liegt jedoch jeweils eine zweite Mutation in *clpC* (*clpCR254S*) bzw. in *murZ* (*murZK23E*) vor. Die *clpCR254S*-Mutation ist in Stamm *shg4* (*AgpsB clpCR254S*) hinreichend für die Akkumulation von MurA, die *murZK23E*-Mutation führt zu einem Aminosäureaustausch im aktiven Zentrum des Proteins und ist damit funktional gleichwertig mit einer $\Delta murZ$ -Deletion einzustufen. Der supprimierende Effekt der $\Delta lmo1549$ - und $\Delta lmo2550$ -Deletionen auf das Wachstum der *AgpsB*-Mutante ist somit tatsächlich MurA-unabhängig, während der durch die $\Delta lmo1503$ und $\Delta lmo1921$ -Deletionen vermittelte Effekt klar MurA-abhängig ist.

Die Deletion von *pbpA1* und *divIVA* führte ebenfalls zur Suppression des Wachstumsdefektes der *AgpsB*-Mutante (Abb. 23C und Abb. A5A). Um zu überprüfen, ob der supprimierende Effekt dieser beiden Deletionen MurA-abhängig ist, wurden die MurA-Proteinmengen der $\Delta pbpA1$ - und $\Delta divIVA$ -Deletionsmutanten bestimmt. Wie erwartet, wiesen die Stämme LMS57 ($\Delta pbpA1$), LMJR38 ($\Delta pbpA1$ *AgpsB*), LMS2 ($\Delta divIVA$) und LMJR28 ($\Delta divIVA$ *AgpsB*) zum Wildtypstamm vergleichbare MurA-Mengen auf. Die Suppression des *AgpsB*-Phänotyps in diesen Mutanten ist somit MurA-unabhängig.

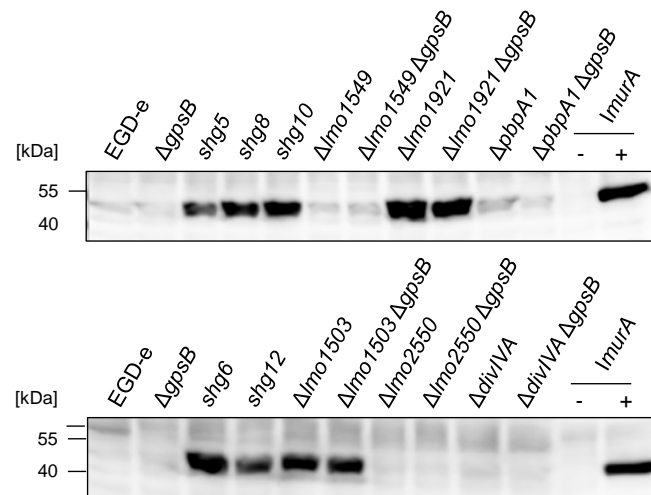


Abb. 35: Effekt der Deletion von *shg*-Genen auf die Expression von *murA*

Westernblots zur Detektion der MurA-Proteinmengen in *L. monocytogenes* Stämmen. Die Stämme EGD-e (wt), LMJR19 ($\Delta gpsB$), *shg5* ($\Delta gpsB$ *clpCR254S lmo1549L44S*), *shg8* ($\Delta gpsB$ *lmo1921H87Y*), *shg10* ($\Delta gpsB$ *lmo1921*¹⁻⁷⁴), LMJR118 ($\Delta lmo1549$), LMJR119 ($\Delta lmo1549 \Delta gpsB$), LMJR121 ($\Delta lmo1921$), LMJR120 ($\Delta lmo1921 \Delta gpsB$), LMS57 ($\Delta pbpA1$), LMJR38 ($\Delta pbpA1 \Delta gpsB$), LMJR123 (*ImurA*), *shg6* ($\Delta gpsB$ *lmo2550E38G murZK23E*), *shg12* ($\Delta gpsB$ *lmo1503*^{RBS}), LMJR136 ($\Delta lmo1503$), LMJR137 ($\Delta lmo1503 \Delta gpsB$), LMJR156 ($\Delta lmo2550$) und LMJR157 ($\Delta lmo2550 \Delta gpsB$), LMS2 ($\Delta divIVA$), LMJR28 ($\Delta divIVA \Delta gpsB$), wurden in BHI-Medium bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von OD₆₀₀=1 angezogen, die zellulären Proteine isoliert und mit Hilfe eines Westernblots analysiert. Zur Detektion von MurA wurde ein MurAA-spezifischer polyklonaler Antikörper verwendet.

3.8.9. Suppression des $\Delta gpsB$ -Phänotyps durch Mutationen in UDP-GlcNAc-konsumierenden Stoffwechselwegen

Die Deletion von *murZ*, *clpC* und *lmo2550* und die Überexpression von *murA* führen zur Suppression des Wachstumsdefektes der $\Delta gpsB$ -Mutante. Auffällig ist, dass alle Mutationen einen Einfluss auf die UDP-N-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc)-Mengen in der Zelle haben. MurA und MurZ verbrauchen UDP-GlcNAc im 1. Schritt der Peptidoglykansynthese. Die Deletion von *murZ* führt zur Akkumulation von MurA, vermutlich durch einen regulatorischen Mechanismus. Darüber hinaus führt die Abwesenheit von ClpC zur Akkumulation von MurA, da die Degradation von MurA durch die ClpCP-Protease nicht mehr erfolgen kann. Die Überexpression von *murA* führt vermutlich zu einem erhöhten Verbrauch von UDP-GlcNAc. *Lmo2550* ist für die Beladung von Wandteichonsäuren mit N-Acetylglucosamin verantwortlich (Eugster *et al.*, 2011). Die Deletion von *lmo2550* führt somit zur Akkumulation von UDP-GlcNAc, das möglicherweise dann von MurA konsumiert werden kann. Möglicherweise sind die UDP-GlcNAc-Mengen in der $\Delta gpsB$ -Mutante verändert, wodurch die Deletion von Genen, die am Verbrauch von UDP-GlcNAc beteiligt sind, den Wachstumsdefekt der $\Delta gpsB$ -Mutante supprimiert. Die Abwesenheit der UDP-GlcNAc konsumierenden Proteine ermöglicht vermutlich, dass UDP-GlcNAc vermehrt durch MurA für die Peptidoglykansynthese eingesetzt werden kann und somit in einer zur

Überexpression von *murA* vergleichbaren Suppression des Wachstumsdefektes der $\Delta gpsB$ -Mutante resultieren könnte.

Neben MurA, MurZ, Lmo2550 und ClpC sind die Proteine MnaA und GtcA an der Konsumierung von UDP-GlcNAc beteiligt. MnaA (Lmo2537) ist eine UDP-N-Acetylglucosamin 2-Epimerase, die UDP-GlcNAc in UDP-N-Acetylmannosamin umwandelt und ist in *L. monocytogenes* essenziell (Dubail *et al.*, 2006). Aufgrund dessen wurden keine Untersuchungen mit MnaA durchgeführt. GtcA (Lmo2549) ist in *L. monocytogenes* zusammen mit Lmo2550 an der Beladung von Wandteichonsäuren mit N-Acetylglucosamin beteiligt (Promadej *et al.*, 1999). Sofern die Hypothese zutrifft, dass die UDP-GlcNAc-Mengen in der $\Delta gpsB$ -Mutante verändert sind, sollte die Deletion von *gtcA* ebenfalls einen supprimierenden Effekt auf das Wachstum haben. Tatsächlich wurde der Wachstumsdefekt der $\Delta gpsB$ -Mutante bei 42°C durch die Deletion von *gtcA* (LMJR170) partiell supprimiert. Dagegen hat die Deletion von *gtcA* im Wildtyphintergrund (LMJR174) keinen Einfluss auf das Wachstum bei 42°C (Abb. 36). Dieses Ergebnis bestärkt die Vermutung, dass die Abwesenheit UDP-GlcNAc-verbrauchender Enzyme den Wachstumsdefekt der $\Delta gpsB$ -Mutante supprimiert. Möglicherweise ist die Menge von UDP-GlcNAc in der $\Delta gpsB$ -Mutante verringert.

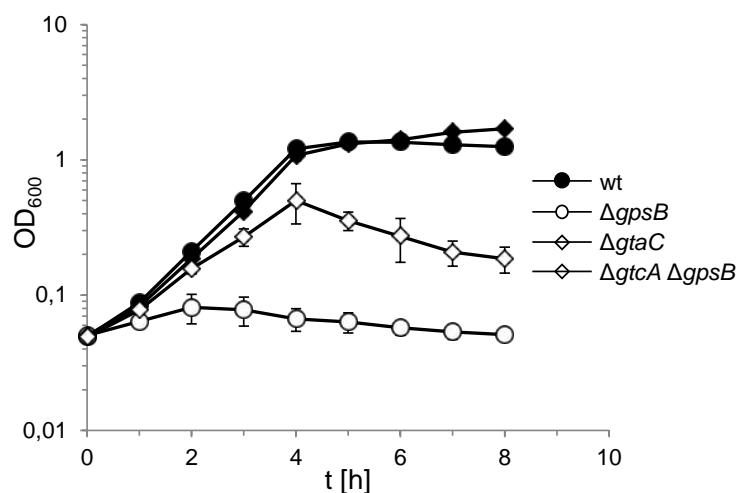


Abb. 36: Deletion von *gtcA* führt zur Suppression des Wachstumsdefektes der $\Delta gpcB$ -Mutante

Die Stämme EGD-e (wt), LMJR19 ($\Delta gpcB$), LMJR174 ($\Delta gtaC$) und LMJR170 ($\Delta gtaC \Delta gpcB$) wurden in BHI-Medium bei 42°C angezogen und die optische Dichte ($\lambda=600$ nm) stündlich gemessen. Mittelwerte und Standardabweichungen ergeben sich aus drei unabhängigen Messungen.

3.8.10. GpsB interagiert mit Lmo1503, Lmo1921, PBP A1 und DivIVA

Zur Überprüfung, ob GpsB mit den Proteinen Lmo1503, Lmo1921 und PBP A1 interagiert, wurden Bacterial Two-Hybrid (B2H) -Assays durchgeführt. Der B2H-Assay zeigte zunächst, dass Lmo1503 und Lmo1921 mit sich selbst interagieren (Abb. 37A+B). Für Lmo1549 wurde hingegen keine Selbstinteraktion detektiert. Damit ist die Expression und die prinzipielle Funktionalität der B2H-Konstrukte für Lmo1503 und Lmo1921 nachgewiesen, die B2H-Fusionen mit Lmo1549 werden hingegen entweder nicht exprimiert, sind nicht funktional oder interagieren nicht miteinander. Wie bereits bekannt, interagierte GpsB mit PBP A1. Weiterhin konnten Protein-Protein-Interaktionen zwischen GpsB und DivIVA, GpsB und Lmo1503 sowie GpsB und Lmo1921 nachgewiesen werden. Dass GpsB mit DivIVA interagiert, ist aus Untersuchungen in *B. subtilis* und *S. pneumoniae* bereits bekannt (Fleuriot *et al.*, 2014, Pompeo *et al.*, 2015). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Lmo1921 mit Lmo1503 und PBP A1 interagiert (Abb. 37A+B). Eine Zusammenfassung aller Protein-Protein-Interaktion ist schematisch in Abb. 37C dargestellt. Für Lmo1549 wurden auch keine Interaktionen zu anderen Proteinen nachgewiesen. Vermutlich sind die entsprechenden B2H-Konstrukte tatsächlich nicht funktional.

Zusätzlich wurde getestet, ob GpsB mit MurA und MurZ interagiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass MurA mit sich selbst interagiert, jedoch nicht mit GpsB. MurZ wies keine Interaktionen weder mit sich selbst noch mit MurA oder GpsB auf, wodurch von einer Funktionsunfähigkeit der Konstrukte ausgegangen werden muss (Abb. A9).

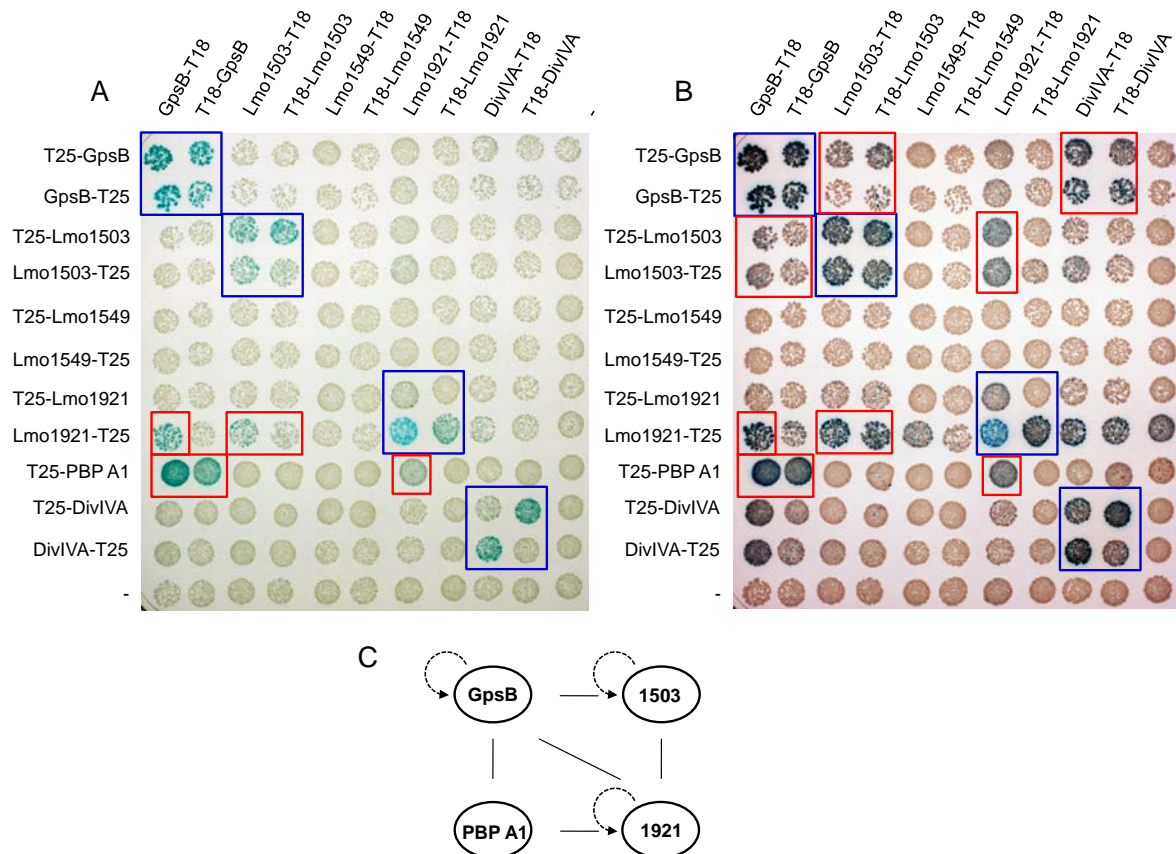


Abb. 37: Interaktion von GpsB mit Lmo1503, Lmo1549, Lmo1921 und DivIVA

(A-B) Zur Analyse der Interaktion von GpsB mit den Proteinen Lmo1503, Lmo1549, Lmo1921 und DivIVA wurde ein Bacterial Two-Hybrid-Assay durchgeführt. Dazu wurden die entsprechenden Gene, mit den T18- und T25-Fragmenten der Adenylatcyclase von *Bordetella pertussis* fusioniert, in den *E. coli*-Stamm BTH101 ko-transformiert und auf Selektionsplatten getropft. Das Ergebnis wurde nach 24 h (A) bzw. 40 h (B) Inkubation bei 30°C fotografiert. Dabei konnten Interaktionen gezeigt werden, bei denen Proteine mit sich selbst interagieren (blaue Kästchen) und bei denen zwei Proteine miteinander interagieren, also Protein-Protein-Interaktionen (rote Kästchen). (C) Das Schema zeigt die nachgewiesenen Selbst-Interaktionen (gestrichelte Linien) und Protein-Protein-Interaktionen (durchgezogene Linien).

4. Diskussion

4.1. GpsB reguliert die Aktivität von PBP A1 in *L. monocytogenes*

GpsB ist in *L. monocytogenes* am Septum und an der lateralen Zellwand lokalisiert und kann mit der Zellmembran über die Aminosäuren L24 und R25 interagieren. Zudem weist *L. monocytogenes* GpsB (*LmGpsB*) eine dynamische Lokalisation auf, die auch für GpsB aus *B. subtilis* (*BsGpsB*) beschrieben wurde (Claessen *et al.*, 2008, Tavares *et al.*, 2008). Dr. Stephanie Großhennig konnte eine Interaktion zwischen *LmGpsB* und PBP A1 in Bacterial Two-Hybrid-Experimenten nachweisen (Rismondo *et al.*, 2015a), die auch für *BsGpsB* und PBP1 gezeigt wurde (Claessen *et al.*, 2008).

BsGpsB ist zusammen mit *EzrA* für die subzelluläre Lokalisation von PBP1 verantwortlich, wobei lediglich die Deletion von *ezrA* zur Delokalisation von PBP1 führt (Claessen *et al.*, 2008). Da *ezrA* in *L. monocytogenes* essenziell ist (Considine *et al.*, 2011), konnte lediglich der Einfluss von GpsB auf die Lokalisation von PBP A1 überprüft werden. PBP A1 lokalisiert wie auch für *B. subtilis* PBP1 gezeigt, unabhängig von *LmGpsB* und kann am Septum und der lateralen Zellwand nachgewiesen werden (Claessen *et al.*, 2008). Die Deletion von *pbpA1* führte zur Suppression des Wachstumsdefektes der Δ *gpsB*-Mutante, wohingegen die Überexpression von *pbpA1* den Wachstumsdefekt der Δ *gpsB*-Mutante verstärkte. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Aktivität von PBP A1 in der Δ *gpsB*-Mutante dereguliert ist.

Die gleichzeitige Abwesenheit von PBP A1 und PBP A2 ist in *L. monocytogenes* letal (Rismondo *et al.*, 2015b). Da die gleichzeitige Abwesenheit von PBP A2 und GpsB in *L. monocytogenes* ebenfalls letal ist, wurde vermutet, dass GpsB für die Aktivität von PBP A1 notwendig ist. PBP A1 ist ein bi-funktionales Penicillin-bindendes Protein, d.h. es besitzt Transglykosylase- und Transpeptidase-Aktivität. Möglicherweise ist GpsB an der Koordinierung dieser beiden Aktivitäten beteiligt. Die Koordinierung der TG- und TP-Aktivität bi-funktionaler PBPs ist notwendig, um die Integrität des Peptidoglykan-Netzwerkes zu gewährleisten. In Simulationen, die das Verständnis der Regulation der Peptidoglykansynthese stäbchenförmiger Bakterien erweitern sollten, konnte gezeigt werden, dass die Integrität des Peptidoglykans ohne die Kontrolle der TG- und TP-Aktivität in wachsenden Zellen gestört wird und zur Bildung von Löchern im Peptidoglykan führen würde (Nguyen *et al.*, 2015). Darüber hinaus kann die Stäbchenform nicht erhalten werden (Nguyen *et al.*, 2015). GpsB ermöglicht möglicherweise die Dimerisierung/Oligomerisierung von PBP A1 und fördert so die Koordinierung der TG- und TP-Aktivität von PBP A1. In Abwesenheit von GpsB in *L. monocytogenes* wäre demnach diese Koordination gestört, wodurch die

Integrität des Peptidoglykans beeinträchtigt wäre. Dies könnte zur gesteigerten Lyse der Zellen führen, wie es für die $\Delta gpbB$ -Mutante beobachtet wurde. Für die Penicillin-bindenden Proteine PBP 1A und PBP 1B aus *E. coli* konnte gezeigt werden, dass sie als Homodimere in der Zelle vorliegen (Zijderveld *et al.*, 1991, Charpentier *et al.*, 2002). Die Dimerisierung von *E. coli* PBP 1B ist beispielsweise auch notwendig, um *in vitro* Peptidoglykan zu synthetisieren, das ein zum *in vivo* synthetisierten Peptidoglykan vergleichbares Crosslinking aufweist (Bertsche *et al.*, 2005). Aufgrund der Anwesenheit eines zweiten bi-funktionalen PBPs, PBP A2, in *L. monocytogenes*, verursacht die Deregulation der TG- und TP-Aktivität in der $\Delta gpbB$ -Mutante keinen letalen Phänotyp. PBP A2 kann wahrscheinlich sowohl die Funktion von PBP A1 übernehmen und darüber hinaus dessen Deregulation, die aus der Deletion von *gpbB* resultiert, partiell ausgleichen, allerdings nicht bei 42°C.

PBP A1 ist am Septum und an der lateralen Zellwand lokalisiert und ist somit vermutlich am Zellwachstum und an der Zellteilung beteiligt. Die Deletion von *gpbB* als auch von *pbpA1* führt zu einer Verlängerung der Zellen, d.h. die laterale Zellwand wird in der $\Delta gpbB$ -Mutante und der $\Delta pbpA1$ -Mutante länger synthetisiert als im Wildtypstamm und die Zellteilung ist verzögert. Möglicherweise fungiert GpsB als negativer Regulator von PBP A1, indem GpsB eine Interaktion von PBP A1 mit weiteren Komponenten des Divisoms herstellt und dadurch die Aktivität von PBP A1 auf einen bestimmten Wirkungsort beschränkt.

4.2. Kristallstruktur von GpsB

Die Kooperationspartner Prof. Dr. Richard J. Lewis und Dr. Robert M. Cleverley (Newcastle University) konnten die Kristallstruktur des N- und C-Terminus von *BsGpsB* getrennt voneinander ermitteln und die Kristallstruktur des N-Terminus von *LmGpsB* bestimmen. SEC-MALLS-Analysen ergaben, dass *BsGpsB*¹⁻⁶⁸ ein Dimer bildet und *BsGpsB*⁶⁹⁻⁹⁸ als Trimer vorliegt. *BsGpsB* bildet demnach im Gegensatz zu DivIVA ein Hexamer in Lösung (Rismondo *et al.*, 2015a). In Bacterial Two-Hybrid Assays konnte gezeigt werden, dass sowohl der N- als auch der C-Terminus an der Interaktion zwischen den GpsB-Monomeren in *L. monocytogenes* beteiligt sind und somit zur Oligomerisierung von GpsB beitragen (Rismondo *et al.*, 2015a). Der N-Terminus von *LmGpsB* (*LmGpsB*¹⁻⁷³) bildet eine Furche bestehend aus den konservierten Aminosäuren L16, E19, K21, T22, Y27, S28, E30, D31, D33, E34, L36, D37 und I40, die vorrangig negativ geladenen sind (Rismondo *et al.*, 2015a). Komplementationsstudien ergaben, dass die Mutationen V32A, L36A, Y27A oder D33A in *gpbB* zur Inaktivität des GpsB-Proteins führen, wohingegen eine partielle Suppression des Wachstumsdefektes bei der Expression von *gpbBD37A* oder *gpbBI40A* in der $\Delta gpbB$ -Mutante

beobachtet werden konnte. Die Aminosäuren V32 und L36 sind an der Dimerisierung von GpsB beteiligt und beeinflussen dadurch auch die Interaktion zwischen GpsB und PBP A1 (Rismondo *et al.*, 2015a). Bacterial Two-Hybrid-Experimente wiesen zudem darauf hin, dass neben V32 und L36 auch die Aminosäuren Y27, D33, D37 und I40 für die Bindung von PBP A1 essenziell sind (Rismondo *et al.*, 2015a). Die negativ geladenen Aminosäuren des N-Terminus von GpsB sind somit an der Interaktion von GpsB mit den positiv geladenen Aminosäuren des zytoplasmatisch lokalisierten N-Terminus von PBP A1 verantwortlich. Dementsprechend äußerte sich die Mutation einer dieser konservierten Aminosäuren in *LmGpsB* in einem Δ *gpsB*-Phänotyp und in einer reduzierten Interaktion von *BsGpsB* und *BsPBP1* (Rismondo *et al.*, 2015a).

Der C-Terminus von *BsGpsB* bildet ein Trimer. Zwischen den beiden Aminosäuren R83 und E88, die in *LmGpsB* R96 und E101 entsprechen, wird eine Salzbrücke gebildet, die essenziell für die Ausbildung der trimeren Struktur ist (Rismondo *et al.*, 2015a). Dies deckt sich mit dem Befund, dass die Proteine *LmGpsB* R96A-Strep und *LmGpsB* E101A-Strep in Blue-Native PAGE-Gelen ein im Vergleich zu GpsB-Strep verändertes Laufverhalten zeigten (Rismondo *et al.*, 2015a). Darüber hinaus konnte die Expression von *gpsBR96A* und *gpsBE101A* in der Δ *gpsB*-Mutante den Wachstumsdefekt bei 42°C nicht supprimieren. Die Aminosäuren R83 und E88 aus *BsGpsB* bzw. R96 und E101 aus *LmGpsB* sind Teil eines RhxxhE-Sequenzmotives, das für die Ausbildung einer dreisträngigen parallel angeordneten coiled-coil-Struktur notwendig ist (Kammerer *et al.*, 2005, Rismondo *et al.*, 2015a).

Das hexamere GpsB-Protein aus *L. monocytogenes* bildet vermutlich eine Dreifuß-artige Struktur aus, bei der der C-Terminus die Basis darstellt (Abb. 38). Die Linker-Region und die Prolin-reiche Region, die mindestens ein Prolin aufweisen, können dabei eine flexible Anordnung der N-Termini gewährleisten, die mit der Zellmembran über die Aminosäuren L24 und R25 interagieren. Das *BsGpsB*- bzw. *LmGpsB*-Hexamer könnte mit 6 PBP1- bzw. PBP A1-Molekülen Interaktionen eingehen. GpsB könnte dadurch dazu beitragen, dass das jeweilige bi-funktionale Penicillin-bindende Protein an den Stellen in der Zelle akkumuliert, an denen GpsB lokalisiert ist und dadurch seine Aktivität steuern.

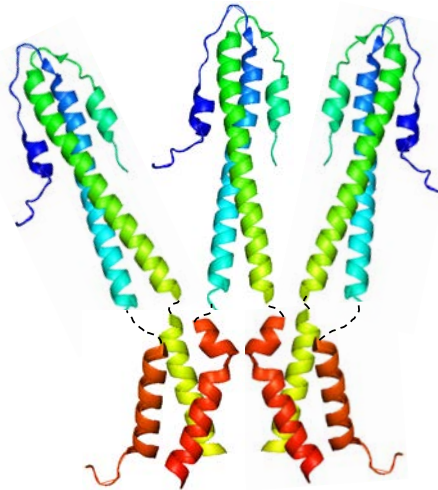


Abb. 38: Hypothetische Struktur des *B. subtilis* GpsB-Hexamers

Hypothetische Anordnung der N (blau-grün)- und C (rot-gelb)-Termini von *B. subtilis* GpsB. Die gestrichelten Linien entsprechen den Linker-Regionen, deren Struktur nicht bestimmt wurde. (PDB: 4UG3 und 5AN5). Modifiziert nach (Rismondo *et al.*, 2015a).

4.3. Letalität der $\Delta pbpA1 \Delta pbpA2$ -Doppelmutante

Die für die beiden bi-funktionalen Penicillin-bindenden Proteine PBP A1 und PBP A2 kodierenden Gene *pbpA1* und *pbpA2* können in *L. monocytogenes* einzeln deletiert werden. Bei Abwesenheit von PBP A1 bzw. PBP A2 kann das jeweils andere Penicillin-bindende Protein die Funktion beider Proteine übernehmen, sie weisen also überlappende Funktionen auf. Viele Organismen besitzen mehrere dieser der Klasse A zuzuordnenden HMW PBPs (Goffin und Ghuysen, 1998). Aufgrund der funktionellen Redundanz dieser Proteine äußert sich die Abwesenheit eines oder mehrerer PBPs in geringen bis keinen Effekten in Bezug auf Wachstum, Zellmorphologie und Zellwandsynthese (Popham und Setlow, 1996, Denome *et al.*, 1999, McPherson *et al.*, 2001). Dementsprechend hatte die Deletion von *pbpA1* oder *pbpA2* in *L. monocytogenes* auch keinen Einfluss auf die Peptidoglykanzusammensetzung. Da die gleichzeitige Deletion beider Klasse A PBPs in *L. monocytogenes* nicht toleriert wird, scheint *L. monocytogenes* kein drittes bi-funktionales HMW PBP und auch keine monofunktionale Transglykosylase (MGT) zu besitzen. Im Gegensatz dazu können in *B. subtilis* alle vier bekannten HMW PBPs der Klasse A, PBP1, PBP2c, PBP2d und PBP4, deletiert werden (Popham und Setlow, 1993, Popham und Setlow, 1994, Popham und Setlow, 1995, McPherson *et al.*, 2001, McPherson und Popham, 2003). Dieser Stamm wächst deutlich langsamer als der Wildtypstamm und bildet Zellen mit variabler Zelllänge, die oftmals auch eine gekrümmte Form haben. Zudem bildet die PBP 1⁻ PBP 2c⁻ PBP 2d⁻ PBP 4⁻-Mutante erhöhte Mengen an Zellwandmaterial entlang des Zellzylinders, die ins Zytoplasma hineinragen (McPherson und Popham, 2003) und die Synthese von Peptidoglykan ist in diesem Stamm immer noch möglich (Popham und Setlow, 1996, McPherson und Popham,

2003). Darüber hinaus konnte eine Transglykosylase-Aktivität mit Protoplasten der PBP 1⁻ PBP 2c⁻ PBP 2d⁻ PBP 4⁻-Mutante von *B. subtilis* *in vitro* nachgewiesen werden. Diese Protoplasten wurden mit radioaktiv markierten UDP-N-Acetylglucosamin und Saccharose inkubiert, die Reaktionsprodukte mittels Papierchromatographie aufgetrennt und der Einbau des radioaktiv markierten UDP-GlcNAc in den polymerisierenden Glykanstrang quantifiziert (McPherson und Popham, 2003). Die mit dieser Methode nachgewiesene Transglykosylase-Aktivität konnte auch durch den bekannten Transglykosylase-Inhibitor Moenomycin inhibiert werden. Die Zugabe von Moenomycin hat jedoch keinen Einfluss auf das Wachstum der PBP 1⁻ PBP 2c⁻ PBP 2d⁻ PBP 4⁻-Mutante in Flüssigmedium, somit konnte die Moenomycin-Sensitivität dieser Transglykosylase-Aktivität *in vivo* nicht bestätigt werden (McPherson und Popham, 2003). In einigen Organismen wie *E. coli*, *S. aureus* und *S. pneumoniae* tragen auch mono-funktionale Transglykosylasen zur Polymerisierung des Glykanstranges bei (Hara und Suzuki, 1984, Park und Matsushashi, 1984, Park *et al.*, 1985, Di Berardino *et al.*, 1996). Im Genom von *B. subtilis* konnte jedoch keine solche MGT identifiziert werden, somit werden die Peptidoglykanstränge in der PBP 1⁻ PBP 2c⁻ PBP 2d⁻ PBP 4⁻-Mutante durch eine bislang unbekannte Transglykosylase polymerisiert (McPherson und Popham, 2003).

S. pneumoniae besitzt neben einer MGT drei bi-funktionale Penicillin-bindende Proteine, PBP1a, PBP1b und PBP2a. Wie in *L. monocytogenes* können alle drei HMW PBPs in *S. pneumoniae* einzeln deletiert werden, die gleichzeitige Deletion von *pbp1a* und *pbp2a* ist hingegen letal (Hoskins *et al.*, 1999, Paik *et al.*, 1999, Land und Winkler, 2011). Ähnlich ist es auch in *E. coli*, wo die Abwesenheit der beiden bi-funktionalen PBPs PBP 1A und PBP 1B zur Letalität führt, obwohl ein weiteres HMW PBP, PBP 1C, und eine mono-funktionale Transglykosylase vorhanden sind (Spratt und Jobanputra, 1977, Suzuki *et al.*, 1978, Yousif *et al.*, 1985, Denome *et al.*, 1999). PBP1a und PBP2a aus *S. pneumoniae*, PBP 1A und PBP 1B aus *E. coli* und PBP A1 und PBP A2 aus *L. monocytogenes* weisen somit essenzielle Funktionen auf, die nicht von anderen Penicillin-bindenden Proteinen oder Proteinen, die an der Peptidoglykansynthese beteiligt sind, übernommen werden können.

4.4. Attenuation der *pbp*-Mutanten

4.4.1. Invasionsdefekt der Δ *pbpA1*- und Δ *pbpA2*-Mutanten

Die Deletion von *pbpA1* und *pbpA2* beeinflusst zwar die Invasion in menschliche Epithelzellen (HeLa-Zellen), jedoch nicht die Phagozytose durch J774.A1-Mausmakrophagen. Zudem ist die intrazelluläre Replikation beider Deletionsmutanten in HeLa-Zellen und den J774.A1-Mausmakrophagen nicht beeinträchtigt. Für die Invasion von

L. monocytogenes in menschliche Epithelzellen werden die Internaline InlA und InlB benötigt, die an den Wirtsrezeptoren E-cadherin bzw. Met binden (Gaillard *et al.*, 1991, Cossart und Lecuit, 1998, Parida *et al.*, 1998, Hamon *et al.*, 2006). Die Bindung zwischen InlA und dem E-cadherin der Mausepithelzellen ist hingegen nicht möglich (Lecuit *et al.*, 1999). InlA weist ein LPXTG-Motiv auf und wird durch die Sortase A (SrtA) kovalent mit der Zellwand verbunden (Navarre und Schneewind, 1994, Lebrun *et al.*, 1996, Bierne *et al.*, 2002). InlB besitzt hingegen GW-Domänen, die nicht-kovalente Interaktionen mit Lipoteichonsäuren, die in der Zellwand verankert sind, eingehen (Braun *et al.*, 1997, Jonquieres *et al.*, 1999). Neben LPXTG-Proteinen und Proteinen mit GW-Domänen gibt es Proteine mit LysM-Domänen, die ebenfalls mit der Zellwand assoziiert sind, z.B. die Autolysine p60 und MurA (NamA) (Bateman und Bycroft, 2000, Carroll *et al.*, 2003, Pilgrim *et al.*, 2003, Bierne und Cossart, 2007, Schmidt *et al.*, 2011). Die Zellwandassoziation der LPXTG-Proteine InlA, Lmo0610 und Lmo0880, des GW-Proteins InlB und der LysM-Proteine p60 und MurA (NamA), die einen Einfluss auf die Invasionsrate von *L. monocytogenes* haben, wird durch die Deletion von *pbpA1* und *pbpA2* allerdings nicht beeinträchtigt (Rismondo *et al.*, 2015b). *L. monocytogenes* weist 19 InlA-Homologe mit LPXTG-Motiven auf (Marraffini *et al.*, 2006), deren Oberflächenassoziation durch die Deletion von *pbpA1* bzw. *pbpA2* ebenfalls beeinträchtigt sein könnte. InlJ ist eins der InlA-Homologe, allerdings hat die Deletion von *inlJ* keinen Einfluss auf die Invasion von *L. monocytogenes* in Epithel-, Endothelzellen oder Makrophagen (Sabet *et al.*, 2005), wodurch davon ausgegangen werden kann, dass InlJ nicht zum Invasionsdefekt der *pbp*-Mutanten beiträgt. Vip, ein weiteres LPXTG-Protein, wird für das Eindringen von *L. monocytogenes* in menschliche Epithelzellen (Caco-2-Zellen) und Mausfibroblasten (L2071) benötigt. Dieses Protein interagiert mit dem Hitzeschockprotein Gp96 und unterdrückt dadurch die Immunantwort der Wirtszelle und fördert damit die Invasion der Bakterien (Cabanès *et al.*, 2005). Daher ist es denkbar, dass die Zellwandassoziation von Vip durch die Deletion von *pbpA1* oder *pbpA2* beeinflusst wird.

Neben der Sortase A, die für die Verankerung der LPXTG-Proteine verantwortlich ist, weist *L. monocytogenes* eine zweite Sortase, Sortase B, auf, die vermutlich Proteine mit einem NXZTN-Motiv erkennt (Bierne *et al.*, 2002, Bierne *et al.*, 2004). Sortase B ist an der Oberflächenassoziation einiger weniger Proteine, beispielsweise des Virulenzfaktors SvpA zuständig (Bierne *et al.*, 2004). SvpA unterstützt den Austritt von *L. monocytogenes* aus dem Phagosom von Makrophagen und beeinträchtigt dadurch das intrazelluläre Wachstum der Bakterien. Da das intrazelluläre Wachstum der $\Delta pbpA1$ bzw. $\Delta pbpA2$ -Mutante in J774.A1-

Mausmakrophagen vergleichbar zum Wildtypstamm ist, ist anzunehmen, dass die Oberflächenassoziation von SvpA durch die Deletion von *pbpA1* bzw. *pbpA2* nicht beeinflusst wird. Darüber hinaus ist die Sortase B auch für die Zellwandassoziation von Lmo2186 zuständig, dessen Funktion jedoch bislang nicht bekannt ist (Pucciarelli *et al.*, 2005).

Internalin B und die Amidase Ami, die beide eine GW-Domäne aufweisen, interagieren mit Phosphoglykanen und unterstützen damit den Invasionsprozess in eukaryotische Zellen (Jonquieres *et al.*, 2001, Milohanic *et al.*, 2001). Die Deletion von *aut*, das für das Autolysin Auto, das ebenfalls eine GW-Domäne besitzt, codiert, äußert sich in einer verringerten Invasion in nicht-phagozytische eukaryotische Zelllinien (Cabanès *et al.*, 2004). Die Oberflächenassoziation von InlB wird durch die Deletion von *pbpA1* bzw. *pbpA2* nicht beeinträchtigt, es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die Assoziation anderer Proteine, die über GW-Domänen mit der Zellwand interagieren, wie z.B. Ami oder Auto in der $\Delta pbpA1$ - oder $\Delta pbpA2$ -Mutante gestört ist.

Es ist auch denkbar, dass die Bindung von Fibronektin, einem dimeren Glykoprotein, das Bestandteil der extrazellulären Matrix der tierischen Gewebe ist (Ruoslahti *et al.*, 1973, Vaheri *et al.*, 1976, Fowler *et al.*, 2000), in den $\Delta pbpA1$ - und $\Delta pbpA2$ -Mutanten beeinträchtigt ist. Pathogene Bakterien haben Oberflächenstrukturen entwickelt, die als MSCRAMMs (microbial surface components recognising adhesive matrix molecules) bezeichnet werden, um an verschiedene Proteine der extrazellulären Matrix z.B. Fibronektin und Proteoglykane wie Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG) zu binden (Patti *et al.*, 1994, Gilot *et al.*, 1999). Die Deletion von *fbpA* in *L. monocytogenes*, das für das Membran-assoziierte Fibronektin-bindende Protein A codiert, führt zu einer reduzierten Adhärenz und damit zu einer verringerten Invasion in Maushepatozyten, die Phagozytose durch Makrophagen ist jedoch vergleichbar zum Wildtypstamm (Dramsı *et al.*, 2004). Zudem hat die Deletion von *fbpA* keinen Einfluss auf die intrazelluläre Replikation von *L. monocytogenes* und die Listerolysin O (LLO)- und InlB-Proteinmengen (Osanai *et al.*, 2013). Der $\Delta fbpA$ -Phänotyp ähnelt demnach den Phänotypen der $\Delta pbpA1$ - und $\Delta pbpA2$ -Mutanten, was die Vermutung der eingeschränkten Fibronektinbindung untermauern würde.

Die Deletion von *pbpA1* oder *pbpA2* könnte jedoch auch einen Einfluss auf die kovalente Bindung der Wandteichonsäuren mit dem Peptidoglykan haben. In *Staphylococcus epidermidis* konnte gezeigt werden, dass Wandteichonsäuren Fibronektin binden können und so zur Adhäsion der Bakterien an die Fibrin-Klumpen im Blut oder an die extrazelluläre Matrix der Epithelzellen beitragen (Aly und Levit, 1987, Chugh *et al.*, 1990, Hussain *et al.*,

2001). Die Abwesenheit von Wandteichonsäuren führt auch in *S. aureus* zur verringerten Interaktion zwischen Fibronectin oder anderen Komponenten der extrazellulären Matrix und den Bakterien, wodurch die Anheftung der Bakterien an Endothelzellen und menschlichen Epithelzellen reduziert wird (Weidenmaier *et al.*, 2004, Weidenmaier *et al.*, 2005). Eine reduzierte Expression oder ein Defekt in der Verankerung der Wandteichonsäuren durch die Deletion von *pbpA1* oder *pbpA2* könnte somit in *L. monocytogenes* zu einem Invasionsdefekt führen. Die Wandteichonsäuren werden in *L. monocytogenes* mit N-Acetylglucosamin durch die Proteine GtcA und Lmo2550 beladen (Promadej *et al.*, 1999, Eugster *et al.*, 2011). Die Deletion von *gtcA* führt zu einer verringerten Invasion von *L. monocytogenes* in Caco-2-Zellen (Autret *et al.*, 2001) und zu einer reduzierten Kolonisierung in Leber, Milz und Gehirn von Mäusen (Faith *et al.*, 2009). Demnach könnte auch die Beladung der Wandteichonsäuren durch die Deletion von *pbpA1* bzw. *pbpA2* beeinträchtigt sein und zum Invasionsdefekt der beiden Deletionsmutanten beitragen.

Im Genom von *L. monocytogenes* sind 133 Oberflächenproteine codiert, die über die verschiedenen Verankerungsmechanismen und Signalmotive, wie das LPXTG-Motiv oder die GW-Domänen, klassifiziert werden können (Glaser *et al.*, 2001, Cabanes *et al.*, 2002). Um herauszufinden, ob und welches dieser vielen oberflächenassoziierten Proteine durch die Deletion von *pbpA1* bzw. *pbpA2* in ihrer Funktionalität eingeschränkt sind, sind noch weitere Untersuchungen nötig.

4.4.2. Attenuation der PBP B1- und PBP B2-Depletionsstämme

Die Depletion von PBP B1 und PBP B2 führt zu einer drastischen Reduktion der Invasion in HeLa-Zellen und zur Unterbindung der Ausbreitung von Zelle zu Zelle. Demnach scheinen andere Faktoren beeinträchtigt zu sein, die zur Attenuation dieser Mutanten beitragen als in den $\Delta pbpA1$ - und $\Delta pbpA2$ -Mutanten. Die Proteinmenge des LPXTG-Proteins Lmo0880 und des Autolysins p60 ist infolge der Depletion von PBP B1 reduziert, die Proteinmengen und die Zellwandassoziation der Proteine InlA, InlB, Lmo0610 und des Autolysins MurA sind hingegen nicht verändert (Rismondo *et al.*, 2015b). In Zellen, die in PBP B1 depletiert sind, werden entweder weniger Lmo0880 und p60 synthetisiert oder durch intrazelluläre Proteasen, die durch die endogene Autolyse des PBP B1-Depletionsstammes nach außen gelangen können, abgebaut. Eine Beeinträchtigung in der Synthese des Autolysins p60 in *L. monocytogenes* äußert sich in einer deutlich reduzierten Invasion in nicht-professionelle embryonale 3T6-Mausfibroblasten (Kuhn und Goebel, 1989, Pilgrim *et al.*, 2003). Zudem führt die Deletion von *iap*, das für p60 codiert, zur Unterbindung der Zell-zu-Zellausbreitung

(Pilgrim *et al.*, 2003). Die reduzierte Oberflächenassoziation von Lmo0880, das eine Kollagen-bindende Domäne aufweist (Bierne und Cossart, 2007), könnte zu einer reduzierten Adhärenz der Bakterien an Epithelzellen und damit einhergehend zu einer reduzierten Invasionsrate führen. Somit könnte die Reduktion von p60 und/oder Lmo0880 für die Attenuation des PBP B1-Depletionsstammes ursächlich sein. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass weitere Virulenzfaktoren oder Prozesse, die für die Virulenz von *L. monocytogenes* wichtig sind, durch die Depletion von PBP B1 beeinträchtigt werden.

Neben den Autolysinen und Virulenzfaktoren, die an der Oberfläche assoziiert sind, können auch Zellwandkomponenten zur Virulenz von Bakterien beitragen. D-Alanyl-Lipoteichonsäuren sind beispielsweise wichtig für die Adhärenz und Virulenz von *L. monocytogenes* (Abachin *et al.*, 2002). Lipoteichonsäuren (LTA) bestehen aus Polyphosphoglycerol, an das D-Alaninester oder Glykosyl-Reste gebunden werden und durch die Glykolipidgruppe in die Membran verankert werden (Fischer *et al.*, 1980, Fischer, 1988, Fischer *et al.*, 1990). Sie zählen neben Flagellenkomponenten, Nukleinsäuren und zyklischem di-Adenosinmonophosphat (c-di-AMP) zu den sogenannten PAMPS (pathogen-associated molecular patterns), die durch die pattern recognition receptors (PRR) erkannt werden und das Immunsystem des Wirts aktivieren (Medzhitov, 2007, Ito, 2014). Die Proteine, die für die Bindung des D-Alaninesters an die LTAs verantwortlich sind, werden im *dlt*-Operon codiert (Perego *et al.*, 1995, Neuhaus *et al.*, 1996, Clemans *et al.*, 1999, Peschel *et al.*, 1999, Boyd *et al.*, 2000). Wenn die D-Alanylierung durch die Deletion von *dlt*-Genen verhindert wird, weist die Zelloberfläche eine erhöhte Elektronegativität auf (Baddiley, 2000, Abachin *et al.*, 2002). Zudem kommt es in Abwesenheit der D-Alaninester zu einer erhöhten Bindung von kationischen Proteinen, z.B. Autolysinen und Adhäsinen, oder kationischen antimikrobiellen Peptiden, was in *Lactobacillus rhamnosus* und *Streptococcus gordonii* zu Veränderungen der Zellmorphologie und Defekten in der Zellteilung oder in *B. subtilis* zu einer erhöhten endogenen Autolyse und Sensitivität gegenüber β -Laktam-Antibiotika führt (Ntamere *et al.*, 1987, Wecke *et al.*, 1997, Clemans *et al.*, 1999). Die Depletion von PBP B1 in *L. monocytogenes* äußert sich ebenfalls in einer erhöhten endogenen Autolyse, die durch die Inkubation mit Penicillin gesteigert werden kann. Möglicherweise können die Lipoteichonsäuren infolge der Depletion von PBP B1 nicht mehr ausreichend mit D-Alaninestern verknüpft werden und dadurch zur gesteigerten Lyse der Zellen führen.

Zellen, in denen PBP B2 depletiert ist, können sich ebenfalls nicht von Zelle zu Zelle ausbreiten. Die Depletion von PBP B2 hat keinen Einfluss auf die Proteinmengen und Zellwandassoziation der getesteten Proteine (Rismondo *et al.*, 2015b), führt jedoch zu einem

starken Zellteilungsdefekt, der sich in einer Verlängerung der Zellen (bis zu 30 µm) manifestiert. Demnach könnte ein anderer Grund für die Attenuation dieses Stammes bestehen. Möglicherweise ist der PBP B2-Depletionsstamm nicht in der Lage, einen polar lokalisierten Aktinschwanz zu bilden, um sich im Wirtszytosol zu bewegen. Ähnliches wurde in einer *Δiap*-Deletionsmutante beobachtet, die das Autolysin p60 nicht mehr synthetisiert und dadurch Zellketten bildet (Pilgrim *et al.*, 2003). ActA, das für die Polymerisierung des Aktins zuständig ist, ist dort lediglich in 5% der Zellen am Pol lokalisiert (Domann *et al.*, 1992, Kocks *et al.*, 1992, Kocks *et al.*, 1993, Pilgrim *et al.*, 2003). Aufgrund dessen bildet diese Mutante ein filamentöses Aktin-Netzwerk, kann sich nicht mehr im Zytosol des Wirtes bewegen und ist dadurch stark attenuiert (Pilgrim *et al.*, 2003). Die aus der Depletion von PBP B2 resultierende Verlängerung der Zellen führt demnach vermutlich zur Beeinträchtigung in der Zell-zu-Zellausbreitung. Zudem würde dieser Zellteilungsdefekt auch den Invasionsdefekt erklären, da InlA ebenfalls an den Zellpolen lokalisiert und wahrscheinlich nicht genug Kontakt zur Wirtszelle und dem Rezeptor E-cadherin bekommt (Lebrun *et al.*, 1996, Bierne *et al.*, 2002, Rafelski und Theriot, 2006). Zellen, deren Zelllänge durch die Depletion von PBP B2 so stark erhöht wurde, können zudem vermutlich nicht durch Phagozytose aufgenommen werden. Die Deletion von *secA2* oder *divIVA* in *L. monocytogenes* äußert sich in der Bildung von Zellketten, die ebenfalls aufgrund der Zelllänge einen Invasionsdefekt haben und in der Zell-zu-Zellausbreitung beeinträchtigt sind (Lenz *et al.*, 2003, Halbedel *et al.*, 2012).

4.5. Attenuation der *ΔgpsB*-Mutante

Da GpsB in *L. monocytogenes* für die Regulation der PBP A1-Aktivität verantwortlich ist, könnte die Deletion von *gpsB* ähnliche Auswirkungen auf die Virulenz haben wie die Deletion von *pbpA1*. Tatsächlich führt die Deletion von *gpsB* zur Bildung kleinerer Plaques im Plaque-Formation-Assay wie es auch für die *ΔpbpA1*-Mutante beobachtet wurde. Zudem hat GpsB keinen Einfluss auf die Phagozytose durch J774.A1-Mausmakrophagen. Die Deletion von *gpsB* führt jedoch zu einer reduzierten intrazellulären Replikation in dieser Zelllinie. Allerdings ist anzunehmen, dass sich lediglich der Wachstumsdefekt der *ΔgpsB*-Mutante, der bei 37°C auftritt, in diesen Infektionsexperimenten widerspiegelt. Bei 30°C wies die *ΔgpsB*-Mutante ein zum Wildtypstamm vergleichbares Wachstum auf, so dass man bei dieser Temperatur mögliche Defekte in der intrazellulären Replikation sehen könnte. In *L. monocytogenes* ist jedoch PrfA für die Expression der wichtigsten Virulenzfaktoren, z.B. *actA*, *plcA* und *plcB*, zuständig (Chakraborty *et al.*, 1992). Die Regulation der PrfA-Aktivität

und der *prfA*-Expression erfolgt über mehrere Mechanismen. Beispielsweise wird die Expression von *prfA* durch einen RNA-Thermosensormechanismus reguliert, der die Translation von *prfA* erst bei 37°C ermöglicht (Johansson *et al.*, 2002). Demnach werden die wichtigsten Virulenzfaktoren bei 30°C nicht exprimiert, weshalb Infektionsexperimente bei diesen Temperaturen keinen Aufschluss über die Rolle von GpsB für das intrazelluläre Wachstum von *L. monocytogenes* geben würden.

Interessanterweise ist die Attenuation der Δ *gpsB*-Mutante in Infektionsexperimenten mit *Galleria mellonella* vergleichbar mit einer Mutante, bei der die gesamte Pathogenitätsinsel LIPI-1 deletiert wurde, die die Gene *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* und *plcB* enthält (Mukherjee *et al.*, 2010). Es ist jedoch unklar, ob die verringerte Virulenz der Δ *gpsB*-Mutante in diesem Infektionsexperiment lediglich auf dem Wachstumsdefekt basiert oder ob die Invasion, die intrazelluläre Replikation oder die Zell-zu-Zellausbreitung in den Wachsmottenlarven durch die Abwesenheit von GpsB gestört ist. Möglicherweise wird die Δ *gpsB*-Mutante durch die endogene Autolyse lediglich eher durch das Immunsystem erkannt und dadurch schneller und effizienter bekämpft. Demnach ist nicht auszuschließen, dass GpsB wie auch DivIVA einen Einfluss auf die Virulenz von *L. monocytogenes* hat (Halbedel *et al.*, 2012), allerdings sollten noch weitere Infektionsexperimente durchgeführt werden, um dies eindeutig nachzuweisen. Beispielsweise könnte getestet werden, ob z.B. die Deletion von *clpC*, *murZ*, *lmo1503* oder *lmo1921* in der Δ *gpsB*-Mutante die verminderte Virulenz ebenso supprimiert wie den Wachstumsdefekt.

4.6. Suppression des Δ *gpsB*-Phänotyps

Die Suppression des Δ *gpsB*-Phänotyps durch die Deletion von *pbpA1* ist lediglich partiell. Daher ist davon auszugehen, dass noch weitere Faktoren durch die Deletion von *gpsB* beeinflusst werden. Durch die Analyse von spontanen Suppressoren, die nach 2-tägigem Wachstum der Δ *gpsB*-Mutante bei 42°C auf BHI-Agar wachsen, konnten Hinweise auf Interaktionspartner und Prozesse, an denen GpsB beteiligt ist, gewonnen werden.

4.6.1. Suppression des Δ *gpsB*-Phänotyps durch Mutationen in *murZ*

In den Suppressoren *shg6*, *shg7* und *shg9* konnten verschiedene Mutationen im *murZ*-Gen identifiziert werden. In Firmicutes gibt es zwei UDP-N-Acetylglucosamin 1-Carboxyvinyltransferasen, MurA und MurZ, die den ersten Schritt der Peptidoglykansynthese katalysieren (Du *et al.*, 2000). MurZ aus *L. monocytogenes* besteht aus 423 Aminosäuren und weist eine Homologie von 47% zu MurA auf. MurA bildet zwei globuläre Domänen aus, die

über Linker miteinander verbunden sind (Abb. 40). Das aktive Zentrum befindet sich zwischen diesen beiden Domänen (Skarzynski *et al.*, 1996, Han *et al.*, 2010, Halavati *et al.*, unpublished). In *E. coli* werden 10 direkte Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Aminosäuren gebildet, die das aktive Zentrum umgeben (Skarzynski *et al.*, 1996) und das MurA-Substrat Phosphoenolpyruvat bindet an Cystein 115 (Cassidy und Kahan, 1973, Wanke und Amrhein, 1993, Brown *et al.*, 1994). Diese Aminosäure wird auch vom Antibiotikum Fosfomycin gebunden, wodurch MurA inhibiert wird (Kahan *et al.*, 1974, Marquardt *et al.*, 1994, Bugg, 1999). Die Aminosäuren K22, R120 und R397 in *E. coli* und *Enterobacter cloacae* MurA umgeben die Phosphonat-Gruppe von Fosfomycin und bilden starke elektrostatische Interaktionen und 5 Wasserstoffbrückenbindungen aus (Skarzynski *et al.*, 1996, Thomas *et al.*, 2004, Han *et al.*, 2010). Die Aminosäuren K22, R120, D305, R331, R371 und R397 sind zudem für die Bindung von Phosphoenolpyruvat an MurA von *E. cloacae* verantwortlich (Schonbrunn *et al.*, 2001, Eschenburg *et al.*, 2003, Eschenburg *et al.*, 2005). In Abb. 39 sind die entsprechenden Aminosäuren in *L. monocytogenes* MurA dargestellt, K22 und R120 sind in allen bekannten MurA-Proteinen konserviert (Skarzynski *et al.*, 1996).

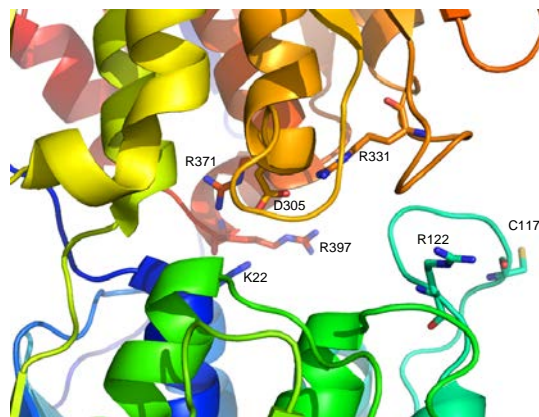


Abb. 39: Aktives Zentrum von MurA aus *L. monocytogenes*

Darstellung der Aminosäuren K22, C117, R122, D305, R331, R371 und R397 in MurA aus *L. monocytogenes* EGD-e (PDB: 3R38) (Halavati *et al.*, unpublished), die vermutlich an der Phosphoenolpyruvat-Bindung beteiligt sind.

In *L. monocytogenes* MurZ entspricht K22 dem Lysin an Position 23, dass in Suppressor *shg6* zu Glutamat mutiert wurde (Abb. 40B). Durch die Mutation K23E wird daher vermutlich die Bindung von Phosphoenolpyruvat durch MurZ beeinträchtigt und somit die Aktivität von MurZ herabgesetzt. In dem Suppressor *shg9* führt eine Punktmutation zur Bildung eines vorzeitigen Stopp-Codons, wodurch ein trunkiertes MurZ-Protein bestehend aus 253 Aminosäuren hergestellt wird (Abb. 40C). Im Gegensatz dazu führt die Insertion von zwei Basenpaaren in das Codon der Aminosäure 101 in MurZ des Suppressors *shg7* zu einem

Frameshift. Dadurch wird in diesem Suppressor ebenfalls ein trunkiertes MurZ-Protein synthetisiert, das lediglich aus 99 Aminosäuren besteht, gefolgt von 41 Aminosäuren, deren Sequenz nicht mit der MurZ-Sequenz übereinstimmt (Abb. 40D). In den Proteinen MurZ¹⁻²⁵³ und MurZ¹⁻⁹⁹ ist lediglich die N-terminale globuläre Domäne vollständig bzw. nur zum Teil vorhanden (Abb. 40C-D). Dadurch kann das aktive Zentrum nicht mehr vollständig ausgebildet werden und das Enzym ist inaktiv. Durch die Inaktivierung von MurZ durch die Mutationen in den Suppressoren *shg6*, *shg7* und *shg9* wurde der Wachstumsdefekt der Δ *gpsB*-Mutante supprimiert. Darüber hinaus führte die ektopische Expression von *murZ*¹⁻²⁵³ und *murZK23E* in der Δ *gpsB*-Mutante zur partiellen Suppression des Wachstumsdefektes bei 42°C. Diese Suppression ist dabei lediglich partiell, da zusätzlich zum trunkierten bzw. mutierten MurZ-Protein das Wildtypprotein vorhanden ist. Das heißt jedoch auch, dass MurZ¹⁻²⁵³ und MurZ K23E dominant gegenüber dem Wildtypprotein sind und dessen Aktivität beeinträchtigen. Dahingegen konnte keine Suppression durch die zusätzliche Expression von *murZ*¹⁻⁹⁹ beobachtet werden. Das Wildtypprotein MurZ ist somit dominant gegenüber dem verkürzten Protein MurZ¹⁻⁹⁹. Möglicherweise ist MurZ¹⁻⁹⁹ zu kurz, um mit dem Wildtypprotein zu interagieren und dessen Aktivität zu beeinflussen.

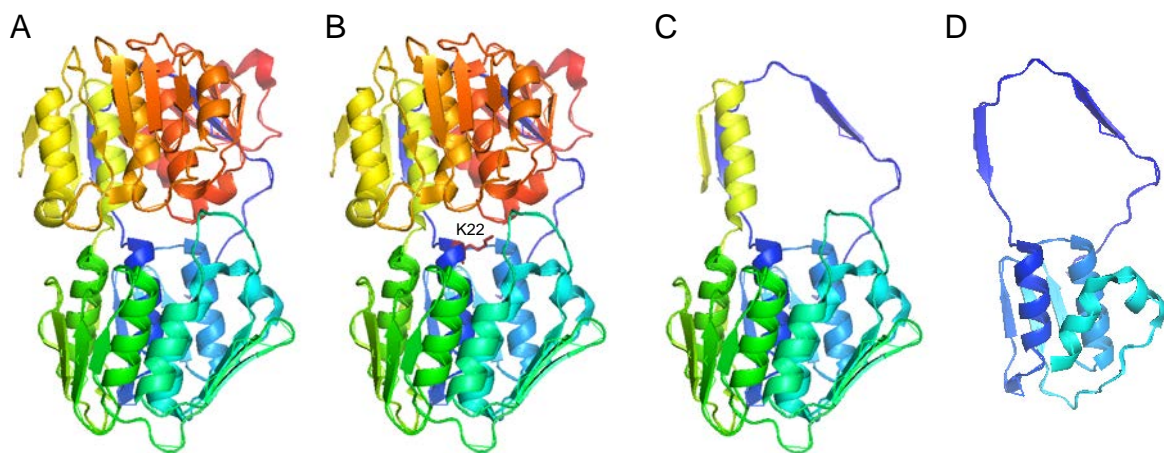


Abb. 40: Kristallstruktur von MurA aus *L. monocytogenes*

(A) Kristallstruktur von MurA aus *L. monocytogenes* EGD-e (PDB: 3R38) (Halavati *et al.*, unpublished). (B) Darstellung der Position K22 in MurA, die in *L. monocytogenes* MurZ K23 entspricht. (C) Darstellung der Struktur der ersten 253 Aminosäuren von MurA. (D) Darstellung der Struktur der ersten 99 Aminosäuren von MurA.

Die Deletion des *murZ*-Gens in der Δ *gpsB*-Mutante äußert sich in einer beinahe vollständigen Suppression des Wachstumsdefektes. Damit wird die Vermutung bestätigt, dass die Proteine MurZ K23E, MurZ¹⁻⁹⁹ und MurZ¹⁻²⁵³ eine reduzierte Aktivität besitzen oder inaktiv sind und die zum Teil nur partielle Suppression bei ektopischer Expression der *murZK23E*, *murZ*¹⁻⁹⁹ und *murZ*¹⁻²⁵³ Allele lediglich auf der Anwesenheit des Wildtypproteins beruht. In *E. cloacae*

konnte gezeigt werden, dass MurA K23R, K23V und K23E lediglich eine Aktivität von weniger als 0,5% des Wildtypproteins aufweisen (Samland *et al.*, 1999), was die Vermutung bestätigt, dass MurZ K23E quasi inaktiv ist. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Inaktivierung von MurZ sowie die Deletion des *murZ*-Gens einen supprimierenden Effekt auf das Wachstum der Δ *gpsB*-Mutante haben.

In den Suppressoren *shg6*, *shg7* und *shg9*, die *murZ*K23E, *murZ*¹⁻⁹⁹ und *murZ*¹⁻²⁵³ exprimieren, in der Δ *murZ*-Einzelmutante und in der Δ *murZ* Δ *gpsB*-Doppelmutante wurden erhöhte MurA-Proteinmengen im Vergleich zum Wildtypstamm nachgewiesen. Die Suppression des Δ *gpsB*-Phänotyps ist daher möglicherweise durch die Akkumulation von MurA bedingt. Die Transkription von *murA* ist in den genannten Stämmen jedoch nicht verändert. Demnach könnte die Translation von *murA* erhöht sein oder ein regulatorischer Mechanismus bestehen, der in Abwesenheit von *murZ* das MurA-Protein stabilisiert und vor Abbau schützt. In *S. aureus* wird *murA* über den gesamten Zellzyklus stärker exprimiert als *murZ*. In Anwesenheit des MurA-Inhibitors Fosfomycin wird jedoch die Expression von *murZ* induziert, um die Zellintegrität zu gewährleisten (Blake *et al.*, 2009). Möglicherweise gibt es in *L. monocytogenes* einen reziproken Mechanismus in Abwesenheit von MurZ. Der Abbau von MurAA, dem MurA-Homolog in *B. subtilis*, erfolgt über die ATPase ClpC und die Protease ClpP (Kock *et al.*, 2004). Da die Deletion von *clpC* in *L. monocytogenes* zur Akkumulation von MurA führt, ist anzunehmen, dass MurA ein Substrat des ClpCP-Komplexes ist. In der Δ *murZ*-Mutante könnte demnach auch die Aktivität von ClpC oder ClpP herabgesetzt sein, wodurch die Stabilität von MurA erhöht wird.

4.6.2. Suppression des Δ *gpsB*-Phänotyps durch Mutationen in *clpC*

Der ClpP-abhängige Abbau von Proteinen spielt eine wichtige Rolle in vielen zellulären Prozessen, wie z.B. zur Kontrolle von Stoffwechselwegen, zum Abbau beschädigter Proteine, zur Kontrolle der Stressantwort, der Zellwandbiosynthese und der Zellteilung (Gottesman und Maurizi, 1992, Squires und Squires, 1992, Msadek *et al.*, 1994, Gottesman *et al.*, 1997, Wickner *et al.*, 1999, Frees *et al.*, 2014).

Zwei Suppressoren, *shg4* und *shg5*, wiesen die Punktmutation R254S im *clpC*-Gen auf. ClpC gehört zur Clp/Hsp100-Familie der AAA+ ATPasen und ist für die ATP-abhängige Entfaltung der ClpC-Substrate und dem anschließenden Transport zu ClpP zuständig (Schirmer *et al.*, 1996, Turgay *et al.*, 1997, Turgay *et al.*, 1998, Krüger *et al.*, 2001, Pan *et al.*, 2001, Nakano *et al.*, 2002). Die Bildung des ClpC-Hexamers und die Zusammenlagerung zum Proteasekomplex ClpCP ist abhängig vom Adapterprotein MecA (Schlothauer *et al.*,

2003, Kirstein *et al.*, 2006). Darüber hinaus rekrutiert MecA spezifische Substrate, z.B. den Kompetenz-Transkriptionsfaktor ComK aus *B. subtilis* (Turgay *et al.*, 1997, Turgay *et al.*, 1998, Dubnau, 1999, Persuh *et al.*, 1999). ClpC besitzt zwei Nukleotidbindedomänen, D1 und D2. Durch die Interaktion der C-terminalen Domäne von MecA mit der D1-Domäne von ClpC wird ClpC aktiviert und die Bildung des ClpCP-Komplexes initiiert (Wang *et al.*, 2011). Die D1-Domäne enthält zwei Loops, Loop 1 besteht in *B. subtilis* aus K252-Y253-R254-G255 und Loop 2 aus G286-A287-G288-G289-A290 (Hinnerwisch *et al.*, 2005, Wang *et al.*, 2011). Die Deletion einer dieser beiden Loops reduziert die ATPase-Aktivität um 80% und verhindert dadurch die Entfaltung und den Abbau der Proteine durch den Proteasekomplex ClpCP (Mei *et al.*, 2009, Wang *et al.*, 2011). Die Aminosäure R254 ist in *B. subtilis* und *L. monocytogenes* konserviert. Die Mutation des Arginins an Position 254 zu einem Serin führt in den beiden Suppressoren demnach vermutlich zu einer reduzierten Aktivität der ATPase ClpC und damit einhergehend zur Reduktion des ClpP-abhängigen Proteinabbaus. Diese Hypothese wird durch den Nachweis der MurA-Akkumulation in den Suppressoren *shg4* und *shg5* bestätigt.

4.6.3. Suppression des *AgpsB*-Phänotyps durch gesteigerte MurA-Proteinmengen

In den Firmicutes *S. pneumoniae*, *S. aureus* und *E. faecalis* können beide *murA*-Gene einzeln deletiert werden, die Kombination beider Deletionen ist hingegen letal (Du *et al.*, 2000, Blake *et al.*, 2009, Vesić und Kristich, 2012). Im Gegensatz dazu sind *murAA* und *murA1* in *B. subtilis* bzw. *B. anthracis* essenziell, wohingegen die Deletion von *murAB* bzw. *murA2* toleriert wird (Kobayashi *et al.*, 2003, Read *et al.*, 2003, Kock *et al.*, 2004, Kedar *et al.*, 2008). Die Deletion von *murA* in *L. monocytogenes* war ebenfalls nicht möglich. Darüber hinaus äußert sich die Depletion von MurA in einem drastischen Wachstumsdefekt bei 37°C und ist bei 42°C letal. Daher ist anzunehmen, dass *murA* auch in *L. monocytogenes* essenziell ist. Die Deletion von *murZ*, *murA2* oder *murAB* in *L. monocytogenes*, *B. anthracis* bzw. *E. faecalis* führt zu keinen drastischen Wachstumsdefekten (Kedar *et al.*, 2008, Vesić und Kristich, 2012). Demzufolge kann die Deletion von *murZ* durch die Aktivität von MurA kompensiert werden. MurA und MurZ haben daher vermutlich überlappende Funktionen. Es ist jedoch auch möglich, dass MurZ nur unter bestimmten Bedingungen aktiv ist, wie beispielsweise unter Nährstoffmangel. MurA scheint hingegen essenzielle Funktionen aufzuweisen, die MurZ nicht übernehmen kann. Die Deletion von *murAA* äußert sich in *E. faecalis* in einer reduzierten Resistenz gegenüber den Cephalosporinen Ceftriaxon und Ceftazidim, einem deutlichen Wachstumsdefekt und einer geschwächten Zellwand (Vesić und

Kristich, 2012). Aufgrund dessen ist anzunehmen, dass MurA die primäre UDP-N-Acetylglucosamin 1-Carboxyvinyltransferase in den meisten Firmicutes ist.

Zur Bestätigung der MurA-abhängigen Suppression des Wachstumsdefektes der *ΔgpsB*-Mutante wurde MurA im *ΔgpsB*-Hintergrund depletiert. Dabei zeigte sich, dass die *ΔgpsB*-Mutante sensibler gegenüber der Depletion von MurA als der Wildtypstamm ist. Dies erklärt möglicherweise auch den gesteigerten Wachstumsdefekt der *ΔgpsB*-Mutante bei 42°C. Die Expression des *clpC*-Gens, das für die ClpC-ATPase kodiert, wird bei Hitzeschock induziert (Krüger *et al.*, 1994, Msadek *et al.*, 1994). In *B. subtilis* konnte gezeigt werden, dass die Halbwertszeit von MurAA bei 37°C bei 55 min liegt und sich durch die Inkubation der Zellen bei 52°C auf 17 min reduziert (Kock *et al.*, 2004). Die Überexpression von *murA* in der *ΔgpsB*-Mutante supprimierte hingegen den Wachstumsdefekt. Dies stellt den ersten Beweis dar, dass erhöhte MurA-Mengen den *ΔgpsB*-Phänotyp supprimieren und ist zugleich der erste Nachweis einer genetischen Verbindung zwischen GpsB und dem ersten Schritt der Peptidoglykansynthese.

Durch die erhöhten MurA-Proteinmengen wird die Peptidoglykansynthese in der *ΔgpsB*-Mutante wahrscheinlich stärker angetrieben. In *E. coli* und *E. cloacae* wird MurA, durch UDP-N-Acetylmuraminsäure (UDP-MurNAc), die durch MurB gebildet wird, gebunden und kompetitiv inhibiert (Mizyed *et al.*, 2005, Zhu *et al.*, 2012). Über diesen negativen Feedback-Loop wird die Aktivität von MurA kontrolliert (Mizyed *et al.*, 2005). Für Gram-positive Bakterien wurde dieser Mechanismus bislang noch nicht beschrieben. Aufgrund der Konservierung der Bindungsstellen von Phosphoenolpyruvat und Fosfomycin ist es jedoch vorstellbar, dass auch die Bindungsstellen von UDP-GlcNAc und UDP-MurNAc konserviert sind. Die erhöhten MurA-Proteinmengen in der *ΔgpsB*-Mutante könnten dann dazu führen, dass die Aktivität von MurA nicht mehr ausreichend durch die Bindung von UDP-MurNAc kontrolliert werden kann, sodass Lipid II vermutlich verstärkt synthetisiert wird. Möglicherweise kann dadurch die beeinträchtigte Aktivität von PBP A1, die aus der Abwesenheit von GpsB resultiert, kompensiert werden.

4.6.3.1 Suppression des *ΔgpsB*-Phänotyps durch Deletion von *lmo1921*

Die Deletion des *lmo1921*-Gens, dessen Funktion bislang noch nicht bekannt ist, führte ebenfalls zu einer Akkumulation von MurA im Wildtyp- und im *ΔgpsB*-Hintergrund und vermutlich dadurch zu einer nahezu vollständigen Suppression des Wachstumsdefektes der *ΔgpsB*-Mutante. Die *Δlmo1921*-Mutante weist einen Wachstumsdefekt bei 42°C auf und bildet kürzere Zellen. Im Gegensatz dazu kommt es in der *ΔgpsB*-Mutante zur Bildung

längerer Zellen. Die Kombination beider Allele in der $\Delta lmo1921 \Delta gpsB$ -Doppelmutante führt zum einen zur gegenseitigen Suppression der Wachstumsdefekte beider Einzelmутanten und zum anderen gleichen sich die gegenteiligen Effekte beider Mutationen auf die Zellteilung aus, da dieser Stamm eine Zelllänge aufweist, die vergleichbar mit dem Wildtypstamm ist. Diese gegenseitige Suppression beider Defekte weist darauf hin, dass GpsB und Lmo1921 gegensätzliche Funktionen haben könnten. In Bacterial Two-Hybrid-Assays konnte gezeigt werden, dass beide Proteine miteinander als auch mit dem Penicillin-bindenden Protein PBP A1 interagieren. Da GpsB die Aktivität von PBP A1 durch Komplexbildung räumlich einschränkt, könnte die Rolle von Lmo1921 darin bestehen, dieser Komplexbildung entgegenzuwirken. Dies würde die gegensätzliche Funktion von Lmo1921 erklären. Fraglich bleibt jedoch, wieso die Deletion von *lmo1921* zur Akkumulation von MurA führt.

Strukturell weist Lmo1921 Homologie zu Ba_1542 aus *B. anthracis* auf (Abb. 41), dessen Kristallstruktur bestimmt wurde, allerdings gibt es bislang keine Untersuchungen zur Funktion von Ba_1542 (Patskovsky *et al.*, unpublished). Um die Funktion von Lmo1921 zu bestimmen und zu überprüfen, welchen Einfluss Lmo1921 auf PBP A1 und auf die MurA-Menge hat, müssen weiterführende Untersuchungen erfolgen. Dazu könnte z.B. überprüft werden, welchen Einfluss die Deletion von *lmo1921* auf das Wachstum und die Zellteilung der $\Delta pbpA1$ -Mutante ausübt.

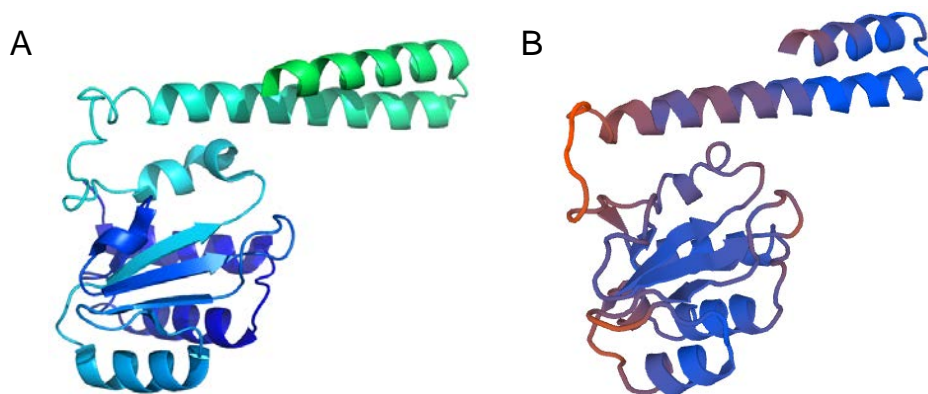


Abb. 41: Struktureller Vergleich von Ba_1542 aus *B. anthracis* und Lmo1921 aus *L. monocytogenes*
 (A) Kristallstruktur von Ba_1542 aus *B. anthracis* (PDB: 3DO9) (Patskovsky *et al.*, unpublished). (B) Strukturvorhersage von Lmo1921 aus *L. monocytogenes* mit dem SWISS-MODEL-Server, basierend auf der Struktur von Ba_1542 (Biasini *et al.*, 2014).

4.6.3.2 Suppression des *ΔgpsB*-Phänotyps durch Mutation in der Ribosomenbindestelle des *lmo1503*-Gens

Der Suppressorstamm *shg12* wies eine Mutation in der Ribosomenbindestelle des *lmo1503*-Gens auf, die vermutlich einen Einfluss auf die Expression von *lmo1503* hat. Die Funktion dieses Gens wurde jedoch bislang nicht untersucht.

Bacterial Two-Hybrid-Analysen zeigten eine Interaktion zwischen GpsB und Lmo1503. Darüber hinaus konnten Interaktionen zwischen Lmo1503 und Lmo1921 nachgewiesen werden. Die Deletion von *lmo1503* in der *ΔgpsB*-Mutante führt zu einer vollständigen Suppression des Wachstumsdefektes der *ΔgpsB*-Mutante. Diese Suppression ist sehr wahrscheinlich durch die Akkumulation von MurA bedingt. Interessanterweise führt die Überexpression von *lmo1503* in der *ΔgpsB*-Mutante zu einem gesteigerten Wachstumsdefekt bei 37°C. Möglicherweise führt die Überexpression von *lmo1503* zur Inhibierung von Prozessen, die in der *ΔgpsB*-Mutante ohnehin schon eingeschränkt ablaufen, z.B. der Peptidoglykansynthese. Die *ΔgpsB*-Mutante ist hypersensitiv gegenüber der Depletion von MurA und somit vermutlich auch hypersensitiv gegenüber der Inhibierung anderer an der Peptidoglykansynthese beteiligter Prozesse. Die Vermutung einer Verbindung zwischen Lmo1503 und der Peptidoglykansynthese wird durch den Nachweis einer Interaktion von Lmo1503 mit GpsB und Lmo1921 bestätigt.

Die *ΔgpsB*- und *Δlmo1503*-Einzelmутanten weisen eine vergleichbare Zelllänge auf wie die *ΔgpsB Δlmo1503*-Doppelmutante. Da sich die Zellteilungsdefekte beider Einzelmутanten in der *ΔgpsB Δlmo1503*-Doppelmutante nicht summieren, ist anzunehmen, dass GpsB und Lmo1503 Funktionen ausüben, die den gleichen Prozess beeinflussen. Der mögliche direkte Einfluss, den die Deletion von *lmo1503* in der *ΔgpsB*-Mutante haben könnte, wird durch die Akkumulation von MurA in diesem Stamm noch zusätzlich maskiert und es bleibt auch hier fraglich, weshalb es zur Akkumulation von MurA in den *Δlmo1503*-Mutanten kommt. Die Deletion von *lmo1503* könnte beispielsweise die Transkription von *murA* beeinflussen. Um dies zu überprüfen, sollte auch von den *Δlmo1503*- und *Δlmo1503 ΔgpsB*-Mutanten RNA isoliert und ein Northernblot unter Verwendung einer *murA*-spezifischen RNA-Sonde angefertigt werden. Es ist auch möglich, dass Lmo1503 einen Einfluss auf die ClpC-Aktivität hat und die Abwesenheit von Lmo1503 bewirkt, dass MurA weniger durch ClpC degradiert wird und dadurch akkumuliert.

Strukturvergleiche geben keinen Hinweis auf die Funktion von Lmo1503 und das homologe Protein aus *B. subtilis*, YrzL, wurde noch nicht charakterisiert.

4.6.4. Suppression des *AgpsB*-Phänotyps durch Mutationen in UDP-GlcNAc-konsumierenden Stoffwechselwegen

Das Lmo2550-Protein, welches in Suppressor *shg6* den Aminosäureaustausch E38G aufweist, und GtcA sind in *L. monocytogenes* für die Beladung von Wandteichonsäuren mit UDP-GlcNAc verantwortlich (Promadej *et al.*, 1999, Eugster *et al.*, 2011). Die Deletion von *lmo2550* oder *gtcA* supprimiert den Wachstumsdefekt der *ΔgpsB*-Mutante teilweise, jedoch nicht über die Akkumulation von MurA. Durch die Abwesenheit von Lmo2550 oder GtcA kann vermutlich mehr UDP-GlcNAc durch MurA für die Peptidoglykansynthese eingesetzt werden. Die Suppression des Wachstumsdefektes ist bei den *Δlmo2550 ΔgpsB*- und *ΔgtcA ΔgpsB*-Doppelmutanten lediglich partiell. Vermutlich kann in diesen Stämmen die Peptidoglykansynthese zwar effizienter erfolgen, ist jedoch limitiert durch die lediglich normalen MurA-Proteinmengen, was sich in der partiellen Suppression widerspiegelt. Um zu überprüfen, ob tatsächlich mehr UDP-GlcNAc in diesen Zellen vorhanden ist und durch MurA genutzt werden kann, sollte der UDP-GlcNAc-Gehalt in den *Δlmo2550*- und *ΔgtcA*-Mutanten im Vergleich zum Wildtypstamm und der *ΔgpsB*-Mutante gemessen werden.

4.6.5. MurA-unabhängige Suppression des *AgpsB*-Phänotyps

Neben der MurA-abhängigen Suppression des Wachstumsdefektes der *ΔgpsB*-Mutante wurden Proteine identifiziert, deren Deletion einen supprimierenden Effekt hat, jedoch nicht zur Akkumulation von MurA führt. Beispielsweise führt die Deletion von *lmo1549* in der *ΔgpsB*-Mutante zur partiellen Suppression des Wachstumsdefektes, die MurA-Proteinmengen sind jedoch vergleichbar zum Wildtypstamm und der *ΔgpsB*-Mutante. Lmo1549 ist als DNA-Reparaturprotein RadC annotiert, allerdings handelt es sich hier um eine falsche Annotation, die auf der Untersuchung der *radC102*-Mutation in *E. coli* basiert (Felzenszwalb *et al.*, 1984, Attaiech *et al.*, 2008). Die *radC102*-Mutation äußerte sich in einer leicht erhöhten Sensitivität gegenüber UV- und Röntgenstrahlen (Felzenszwalb *et al.*, 1984). Später konnte jedoch gezeigt werden, dass die *radC102*-Mutation im *recG*-Gen liegt, das für eine DNA-Helikase codiert (Lombardo und Rosenberg, 2000). Demnach konnte bislang keine Funktion für das eigentliche *radC*-Gen und dessen Homologe wie *lmo1549* bestimmt werden.

Da die Deletion von *lmo1549* im Wildtypstamm zur Verkürzung der Zellen und in der *ΔgpsB*-Mutante zur Zellverlängerung führt, wurde vermutet, dass Lmo1549 eine Rolle in der Zellteilung spielt. Zudem befindet sich das Gen *lmo1549* vor dem *mreBCD*-Operon, was auf eine Rolle in der Zellmorphogenese hinweist. Lmo1549 weist im C-Terminus eine DUF2466-Domäne auf. Die DUF-2466-Domäne enthält ein Jab1/MPN/Mov34 Metalloenzym-Motiv

(JAMM-Motiv), EX_nHXHX₁₀D, das für die Bindung von Zink-Ionen benötigt wird und gleichzeitig das aktive Zentrum einer Isopeptidase darstellt (Rawlings und Barrett, 1995, Cope *et al.*, 2002, Verma *et al.*, 2002). Zu Proteinen, die eine JAMM-Domäne aufweisen, gehören regulatorische Untereinheiten des 26S-Proteasoms der Eukaryoten, z.B. Rpn11, Untereinheiten des eukaryotischen Initiationsfaktors 3 (eIF3) und Regulatoren von Transkriptionsfaktoren (Aravind und Ponting, 1998, Lyapina *et al.*, 2001, Schwechheimer *et al.*, 2001, Cope *et al.*, 2002, Verma *et al.*, 2002). Proteine, die durch das 26S-Proteasom abgebaut werden sollen, werden ubiquitinyliert. Die Isopeptidase Rpn11 aus *Saccharomyces cerevisiae* spaltet vor dem Proteinabbau die Isopeptidbindung zwischen dem zu degradierenden Protein und dem Ubiquitin-Signal (Verma *et al.*, 2002). Proteine, die ein JAMM-Motiv aufweisen, wurden in Eukaryoten, Archaeen und Bakterien gefunden (Cope *et al.*, 2002, Iyer *et al.*, 2006). Prokaryoten weisen daher Vorläufer des eukaryotischen Ubiquitinsignalsystems auf, die vermutlich ähnliche Funktionen haben (Iyer *et al.*, 2006). Archaeen besitzen Ubiquitin-ähnliche Proteine, die sogenannten SAMPs (small archaeal modifier proteins), die Proteine posttranslational markieren. Das Protein HvJAMM1 aus *Haloferax volcanii* ist für die Abspaltung des SAMP-Signals zuständig und weist damit funktionelle Ähnlichkeit zu Rpn11 aus *S. cerevisiae* auf (Verma *et al.*, 2002, Hepowit *et al.*, 2012). Das Protein AfJAMM aus dem Archaeobakterium *Archaeoglobobolus fulgidus*, das durch AF2198 codiert wird, weist eine strukturelle Ähnlichkeit mit der Cytidineaminase CDA aus *B. subtilis* auf (Ambroggio *et al.*, 2004). Eine Funktion konnte jedoch nicht bestimmt werden. Proteine mit einer JAMM-Domäne sind in Bakterien bislang wenig untersucht. In *M. tuberculosis* spaltet das JAMM-Protein Mec⁺ (Rv1334) im Verlauf der Cysteinbiosynthese das CysO-Cystein-Addukt, wodurch Cystein freigelassen und das Schwefelcarrier-Protein CysO regeneriert wird (Burns *et al.*, 2005).

Vergleicht man eine vorhergesagte Struktur des C-Terminus von Lmo1549 (Aminosäuren 102-224) aus *L. monocytogenes* mit den Kristallstrukturen von AfJAMM aus *A. fulgidus* und von RadC aus *Chlorobium tepidum* TLS sind strukturelle Ähnlichkeiten zu erkennen (Ambroggio *et al.*, 2004, Zhang *et al.*, unpublished) (Abb. 42). Aufgrund dieser strukturellen Ähnlichkeiten kann vermutet werden, dass Lmo1549 ebenfalls eine Metall-abhängige Isopeptidase oder Hydrolase ist. Offensichtlich ist Lmo1549 an der Regulation von Prozessen beteiligt, die einen Einfluss auf die Zellteilung haben. Iyer *et al.* postulierten, dass die Proteine, die vor oder nach einem Protein mit JAMM-Domäne, codiert sind, auf die Funktion des JAMM-Proteins hinweisen (Iyer *et al.*, 2006). Beispielsweise befindet sich das *mec*-Gen, das für Mec⁺ aus *M. tuberculosis* codiert, vor den Genen der Cysteinbiosynthese *cysO* und

cysM. Interessanterweise liegt das Gen *lmo1549* direkt vor dem *mreBCD minCD*-Gencluster. Somit hat Lmo1549 möglicherweise Einfluss auf die zellformbestimmenden Proteine MreBCD oder den MinCD-Komplex, der an der Positionierung des FtsZ-Rings beteiligt ist (Marston *et al.*, 1998, Marston und Errington, 1999). Zur Bestimmung der genauen Funktion von Lmo1549 müssen jedoch noch weitere Experimente durchgeführt werden.

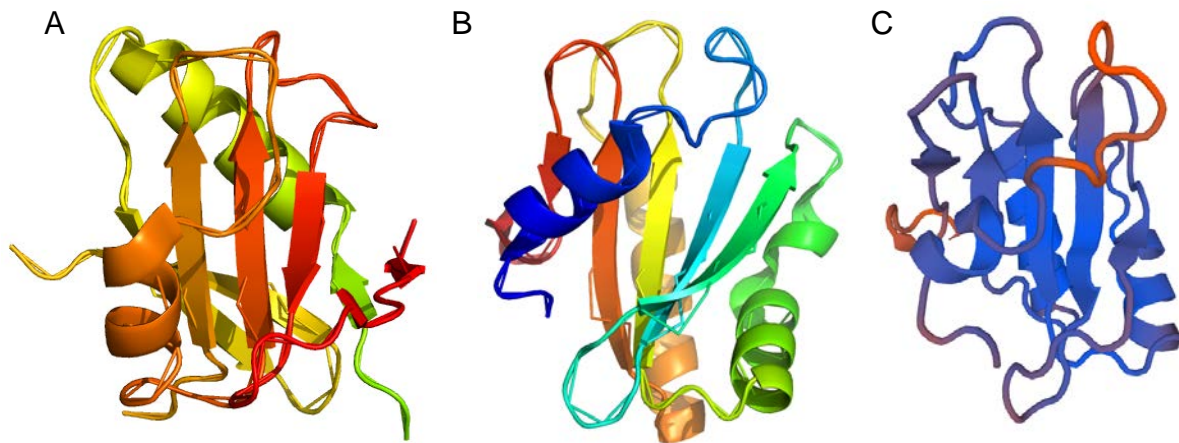


Abb. 42: Struktureller Vergleich von AfJAMM aus *A. fulgidus*, RadC aus *C. tepidum* TLS und Lmo1549 aus *L. monocytogenes*

(A) Kristallstruktur von AfJAMM aus *A. fulgidus* (PDB: 1R5X) (Ambroggio *et al.*, 2004). (B) Kristallstruktur von RadC aus *C. tepidum* TLS (PDB: 2QLC) (Zhang *et al.*, unpublished). (C) Strukturvorhersage von Lmo1549 aus *L. monocytogenes* mit dem SWISS-MODEL-Server, der die Struktur basierend auf der Struktur homologer Proteine erstellt (Biasini *et al.*, 2014).

5. Referenzen

- AARESTRUP, F. M. 2005. Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 96, 271-81.
- AARON, M., CHARBON, G., LAM, H., SCHWARZ, H., VOLLMER, W. & JACOBS-WAGNER, C. 2007. The tubulin homologue FtsZ contributes to cell elongation by guiding cell wall precursor synthesis in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol*, 64, 938-52.
- ABACHIN, E., POYART, C., PELLEGRINI, E., MILOHANIC, E., FIEDLER, F., BERCHE, P. & TRIEU-CUOT, P. 2002. Formation of D-alanyl-lipoteichoic acid is required for adhesion and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol*, 43, 1-14.
- ABHAYAWARDHANE, Y. & STEWART, G. C. 1995. *Bacillus subtilis* possesses a second determinant with extensive sequence similarity to the *Escherichia coli mreB* morphogene. *J Bacteriol*, 177, 765-73.
- ADAMS, D. W. & ERRINGTON, J. 2009. Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. *Nat Rev Microbiol*, 7, 642-53.
- ALLERBERGER, F. & WAGNER, M. 2010. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *Clin Microbiol Infect*, 16, 16-23.
- ALY, R. & LEVIT, S. 1987. Adherence of *Staphylococcus aureus* to squamous epithelium: role of fibronectin and teichoic acid. *Rev Infect Dis*, 9 Suppl 4, S341-50.
- AMBROGGIO, X. I., REES, D. C. & DESHAIES, R. J. 2004. JAMM: a metalloprotease-like zinc site in the proteasome and signalosome. *PLoS Biol*, 2, E2.
- ANDERSSON, D. I. 2003. Persistence of antibiotic resistant bacteria. *Curr Opin Microbiol*, 6, 452-6.
- ARAKI, Y., SHIMADA, A. & ITO, E. 1966. Effect of penicillin on cell wall mucopeptide synthesis in a *Escherichia coli* particulate system. *Biochem Biophys Res Commun*, 23, 518-25.
- ARAVIND, L. & PONTING, C. P. 1998. Homologues of 26S proteasome subunits are regulators of transcription and translation. *Protein Sci*, 7, 1250-4.
- ARNAUD, M., CHASTANET, A. & DEBARBOUILLE, M. 2004. New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, Gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 70, 6887-91.
- ATRIH, A., BACHER, G., ALLMAIER, G., WILLIAMSON, M. P. & FOSTER, S. J. 1999. Analysis of peptidoglycan structure from vegetative cells of *Bacillus subtilis* 168 and role of PBP 5 in peptidoglycan maturation. *J Bacteriol*, 181, 3956-66.
- ATTAIECH, L., GRANADEL, C., CLAVERY, J. P. & MARTIN, B. 2008. RadC, a misleading name? *J Bacteriol*, 190, 5729-32.
- AURELI, P., FIORUCCI, G. C., CAROLI, D., MARCHIARO, G., NOVARA, O., LEONE, L. & SALMASO, S. 2000. An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. *N Engl J Med*, 342, 1236-41.
- AUTRET, N., DUBAIL, I., TRIEU-CUOT, P., BERCHE, P. & CHARBIT, A. 2001. Identification of new genes involved in the virulence of *Listeria monocytogenes* by signature-tagged transposon mutagenesis. *Infect Immun*, 69, 2054-65.
- BADDILEY, J. 2000. Teichoic acids in bacterial coaggregation. *Microbiology*, 146 (Pt 6), 1257-8.
- BANZHAF, M., VAN DEN BERG VAN SAPAROE, B., TERRAK, M., FRAIPONT, C., EGAN, A., PHILIPPE, J., ZAPUN, A., BREUKINK, E., NGUYEN-DISTECHE, M., DEN BLAAUWEN, T. & VOLLMER, W. 2012. Cooperativity of peptidoglycan synthases active in bacterial cell elongation. *Mol Microbiol*, 85, 179-94.
- BARAK, I. & YOUNGMAN, P. 1996. SpoIIE mutants of *Bacillus subtilis* comprise two distinct phenotypic classes consistent with a dual functional role for the SpoIIE protein. *J Bacteriol*, 178, 4984-9.
- BARRETT, D., WANG, T. S., YUAN, Y., ZHANG, Y., KAHNE, D. & WALKER, S. 2007. Analysis of glycan polymers produced by peptidoglycan glycosyltransferases. *J Biol Chem*, 282, 31964-71.
- BATEMAN, A. & BYCROFT, M. 2000. The structure of a LysM domain from *E. coli* membrane-bound lytic murein transglycosylase D (MltD). *J Mol Biol*, 299, 1113-9.
- BEGG, K. J. & DONACHIE, W. D. 1985. Cell shape and division in *Escherichia coli*: experiments with shape and division mutants. *J Bacteriol*, 163, 615-22.
- BEILHARZ, K., NOVAKOVA, L., FADDA, D., BRANNY, P., MASSIDDA, O. & VEENING, J. W. 2012. Control of cell division in *Streptococcus pneumoniae* by the conserved Ser/Thr protein kinase StkP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, E905-13.
- BEN-YEHUDA, S. & LOSICK, R. 2002. Asymmetric cell division in *B. subtilis* involves a spiral-like intermediate of the cytokinetic protein FtsZ. *Cell*, 109, 257-66.
- BEN-YEHUDA, S., RUDNER, D. Z. & LOSICK, R. 2003. RacA, a bacterial protein that anchors chromosomes to the cell poles. *Science*, 299, 532-6.
- BERCHE, P. 1995. Bacteremia is required for invasion of the murine central nervous system by *Listeria monocytogenes*. *Microb Pathog*, 18, 323-36.

- BERDY, J. 2012. Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *J Antibiot (Tokyo)*, 65, 441.
- BERG, K. H., STAMSAS, G. A., STRAUME, D. & HAVARSTEIN, L. S. 2013. Effects of low PBP2b levels on cell morphology and peptidoglycan composition in *Streptococcus pneumoniae* R6. *J Bacteriol*, 195, 4342-54.
- BERTSCH, D., RAU, J., EUGSTER, M. R., HAUG, M. C., LAWSON, P. A., LACROIX, C. & MEILE, L. 2013. *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. *Int J Syst Evol Microbiol*, 63, 526-32.
- BERTSCHE, U., BREUKINK, E., KAST, T. & VOLLMER, W. 2005. *In vitro* murein peptidoglycan synthesis by dimers of the bifunctional transglycosylase-transpeptidase PBP1B from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 280, 38096-101.
- BI, E. F. & LUTKENHAUS, J. 1991. FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature*, 354, 161-4.
- BIASINI, M., BIENERT, S., WATERHOUSE, A., ARNOLD, K., STUDER, G., SCHMIDT, T., KIEFER, F., CASSARINO, T. G., BERTONI, M., BORDOLI, L. & SCHWEDE, T. 2014. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res*, 42, W252-8.
- BIERNE, H. & COSSART, P. 2007. *Listeria monocytogenes* surface proteins: from genome predictions to function. *Microbiol Mol Biol Rev*, 71, 377-97.
- BIERNE, H., GARANDEAU, C., PUCCIARELLI, M. G., SABET, C., NEWTON, S., GARCIA-DEL PORTILLO, F., COSSART, P. & CHARBIT, A. 2004. Sortase B, a new class of sortase in *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol*, 186, 1972-82.
- BIERNE, H., MAZMANIAN, S. K., TROST, M., PUCCIARELLI, M. G., LIU, G., DEHOUX, P., JANSCH, L., GARCIA-DEL PORTILLO, F., SCHNEEWIND, O., COSSART, P. & EUROPEAN LISTERIA GENOME, C. 2002. Inactivation of the *srtA* gene in *Listeria monocytogenes* inhibits anchoring of surface proteins and affects virulence. *Mol Microbiol*, 43, 869-81.
- BIGLAND, C. H. 1950. A report on the isolation of *Listeria* (*Listerella*) organisms from a canary and a chicken in the province of Alberta. *Can J Comp Med Vet Sci*, 14, 319-24.
- BLAKE, K. L., O'NEILL, A. J., MENGIN-LECREULX, D., HENDERSON, P. J., BOSTOCK, J. M., DUNSMORE, C. J., SIMMONS, K. J., FISHWICK, C. W., LEEDS, J. A. & CHOPRA, I. 2009. The nature of *Staphylococcus aureus* MurA and MurZ and approaches for detection of peptidoglycan biosynthesis inhibitors. *Mol Microbiol*, 72, 335-43.
- BLANOT, S., BOUMAILA, C. & BERCHE, P. 1999. Intracerebral activity of antibiotics against *Listeria monocytogenes* during experimental rhombencephalitis. *J Antimicrob Chemother*, 44, 565-8.
- BLUMBERG, P. M. & STROMINGER, J. L. 1974. Interaction of penicillin with the bacterial cell: penicillin-binding proteins and penicillin-sensitive enzymes. *Bacteriol Rev*, 38, 291-335.
- BOERSMA, M. J., KURU, E., RITTICHER, J. T., VANNIEUWENHZE, M. S., BRUN, Y. V. & WINKLER, M. E. 2015. Minimal Peptidoglycan (PG) Turnover in Wild-Type and PG Hydrolase and Cell Division Mutants of *Streptococcus pneumoniae* D39 Growing Planktonically and in Host-Relevant Biofilms. *J Bacteriol*, 197, 3472-85.
- BONECA, I. G. 2005. The role of peptidoglycan in pathogenesis. *Curr Opin Microbiol*, 8, 46-53.
- BONECA, I. G., DUSSURGET, O., CABANES, D., NAHORI, M. A., SOUSA, S., LECUIT, M., PSYLINAKIS, E., BOURIOTIS, V., HUGOT, J. P., GIOVANNINI, M., COYLE, A., BERTIN, J., NAMANE, A., ROUSSELLE, J. C., CAYET, N., PREVOST, M. C., BALLOY, V., CHIGNARD, M., PHILPOTT, D. J., COSSART, P. & GIRARDIN, S. E. 2007. A critical role for peptidoglycan N-deacetylation in *Listeria* evasion from the host innate immune system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 997-1002.
- BORN, P., BREUKINK, E. & VOLLMER, W. 2006. *In vitro* synthesis of cross-linked murein and its attachment to sacculi by PBP1A from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 281, 26985-93.
- BOYD, D. A., CVITKOVITCH, D. G., BLEIWEIS, A. S., KIRIUKHIN, M. Y., DEBABOV, D. V., NEUHAUS, F. C. & HAMILTON, I. R. 2000. Defects in D-alanyl-lipoteichoic acid synthesis in *Streptococcus mutans* results in acid sensitivity. *J Bacteriol*, 182, 6055-65.
- BRAMBILLA, L., MORAN-BARRIO, J. & VIALE, A. M. 2014. Low-molecular-mass penicillin binding protein 6b (DacD) is required for efficient GOB-18 metallo-beta-lactamase biogenesis in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 58, 205-11.
- BRAMKAMP, M., EMMINS, R., WESTON, L., DONOVAN, C., DANIEL, R. A. & ERRINGTON, J. 2008. A novel component of the division-site selection system of *Bacillus subtilis* and a new mode of action for the division inhibitor MinCD. *Mol Microbiol*, 70, 1556-69.
- BRAMKAMP, M. & VAN BAARLE, S. 2009. Division site selection in rod-shaped bacteria. *Curr Opin Microbiol*, 12, 683-8.
- BRAUN, L., DRAMSI, S., DEHOUX, P., BIERNE, H., LINDAHL, G. & COSSART, P. 1997. InlB: an invasion protein of *Listeria monocytogenes* with a novel type of surface association. *Mol Microbiol*, 25, 285-94.

- BRILEY, K., JR., PREPIAK, P., DIAS, M. J., HAHN, J. & DUBNAU, D. 2011. Maf acts downstream of ComGA to arrest cell division in competent cells of *B. subtilis*. *Mol Microbiol*, 81, 23-39.
- BROWN, E. D., MARQUARDT, J. L., LEE, J. P., WALSH, C. T. & ANDERSON, K. S. 1994. Detection and characterization of a phospholactoyl-enzyme adduct in the reaction catalyzed by UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase, MurZ. *Biochemistry*, 33, 10638-45.
- BROWN, E. D., VIVAS, E. I., WALSH, C. T. & KOLTER, R. 1995. MurA (MurZ), the enzyme that catalyzes the first committed step in peptidoglycan biosynthesis, is essential in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 177, 4194-7.
- BRUMFITT, W., WARDLAW, A. C. & PARK, J. T. 1958. Development of lysozyme-resistance in *Micrococcus lysodieticus* and its association with an increased O-acetyl content of the cell wall. *Nature*, 181, 1783-4.
- BUGG, T. D. H. 1999. Bacterial peptidoglycan biosynthesis and its inhibition. *Comprehensive Natural Products Chemistry*, 3, 241-294.
- BURMAN, L. G., RAICHLER, J. & PARK, J. T. 1983. Evidence for diffuse growth of the cylindrical portion of the *Escherichia coli* murein sacculus. *J Bacteriol*, 155, 983-8.
- BURNS, K. E., BAUMGART, S., DORRESTEIN, P. C., ZHAI, H., MCLAFFERTY, F. W. & BEGLEY, T. P. 2005. Reconstitution of a new cysteine biosynthetic pathway in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Am Chem Soc*, 127, 11602-3.
- CABANES, D., DEHOUX, P., DUSSURGET, O., FRANGEUL, L. & COSSART, P. 2002. Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*. *Trends Microbiol*, 10, 238-45.
- CABANES, D., DUSSURGET, O., DEHOUX, P. & COSSART, P. 2004. Auto, a surface associated autolysin of *Listeria monocytogenes* required for entry into eukaryotic cells and virulence. *Mol Microbiol*, 51, 1601-14.
- CABANES, D., SOUSA, S., CEBRIA, A., LECUIT, M., GARCIA-DEL PORTILLO, F. & COSSART, P. 2005. Gp96 is a receptor for a novel *Listeria monocytogenes* virulence factor, Vip, a surface protein. *EMBO J*, 24, 2827-38.
- CABELLO, F. C. 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ Microbiol*, 8, 1137-44.
- CALLEWAERT, L. & MICHIELS, C. W. 2010. Lysozymes in the animal kingdom. *J Biosci*, 35, 127-60.
- CAMEJO, A., CARVALHO, F., REIS, O., LEITAO, E., SOUSA, S. & CABANES, D. 2011. The arsenal of virulence factors deployed by *Listeria monocytogenes* to promote its cell infection cycle. *Virulence*, 2, 379-94.
- CARBALLIDO-LOPEZ, R. & ERRINGTON, J. 2003. The bacterial cytoskeleton: *in vivo* dynamics of the actin-like protein Mbl of *Bacillus subtilis*. *Dev Cell*, 4, 19-28.
- CARBALLIDO-LOPEZ, R. & FORMSTONE, A. 2007. Shape determination in *Bacillus subtilis*. *Curr Opin Microbiol*, 10, 611-6.
- CARBALLIDO-LOPEZ, R., FORMSTONE, A., LI, Y., EHRLICH, S. D., NOIROT, P. & ERRINGTON, J. 2006. Actin homolog MreBH governs cell morphogenesis by localization of the cell wall hydrolase LytE. *Dev Cell*, 11, 399-409.
- CARROLL, S. A., HAIN, T., TECHNOW, U., DARJI, A., PASHALIDIS, P., JOSEPH, S. W. & CHAKRABORTY, T. 2003. Identification and characterization of a peptidoglycan hydrolase, MurA, of *Listeria monocytogenes*, a muramidase needed for cell separation. *J Bacteriol*, 185, 6801-8.
- CASSIDY, P. J. & KAHAN, F. M. 1973. A stable enzyme-phosphoenolpyruvate intermediate in the synthesis of uridine-5'-diphospho-N-acetyl-2-amino-2-deoxyglucose 3-O-enolpyruvyl ether. *Biochemistry*, 12, 1364-74.
- CHA, J. H. & STEWART, G. C. 1997. The *divIVA* minicell locus of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 179, 1671-83.
- CHAKRABORTY, T., LEIMEISTER-WÄCHTER, M., DOMANN, E., HARTL, M., GOEBEL, W., NICHTERLEIN, T. & NOTERMANS, S. 1992. Coordinate regulation of virulence genes in *Listeria monocytogenes* requires the product of the *prfA* gene. *J Bacteriol*, 174, 568-74.
- CHARPENTIER, X., CHALUT, C., REMY, M. H. & MASSON, J. M. 2002. Penicillin-binding proteins 1a and 1b form independent dimers in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 184, 3749-52.
- CHASTANET, A., DERRE, I., NAIR, S. & MSADEK, T. 2004. *clpB*, a novel member of the *Listeria monocytogenes* CtsR regulon, is involved in virulence but not in general stress tolerance. *J Bacteriol*, 186, 1165-74.
- CHIARA, M., CARUSO, M., D'ERCHIA, A. M., MANZARI, C., FRACCALVIERI, R., GOFFREDO, E., LATORRE, L., MICCOLUPO, A., PADALINO, I., SANTAGADA, G., CHIOCCO, D., PESOLE, G., HORNER, D. S. & PARISI, A. 2015. Comparative Genomics of *Listeria Sensu Lato*: Genus-Wide Differences in Evolutionary Dynamics and the Progressive Gain of Complex, Potentially Pathogenicity-Related Traits through Lateral Gene Transfer. *Genome Biol Evol*, 7, 2154-72.
- CHUGH, T. D., BURNS, G. J., SHUHAIBER, H. J. & BAHR, G. M. 1990. Adherence of *Staphylococcus epidermidis* to fibrin-platelet clots *in vitro* mediated by lipoteichoic acid. *Infect Immun*, 58, 315-9.

- CLAESSEN, D., EMMINS, R., HAMOEN, L. W., DANIEL, R. A., ERRINGTON, J. & EDWARDS, D. H. 2008. Control of the cell elongation-division cycle by shuttling of PBP1 protein in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 68, 1029-46.
- CLEMANS, D. L., KOLENBRANDER, P. E., DEBABOV, D. V., ZHANG, Q., LUNSFORD, R. D., SAKONE, H., WHITTAKER, C. J., HEATON, M. P. & NEUHAUS, F. C. 1999. Insertional inactivation of genes responsible for the D-alanylation of lipoteichoic acid in *Streptococcus gordonii* DL1 (Challis) affects intragenetic coaggregations. *Infect Immun*, 67, 2464-74.
- COLE, R. M. & HAHN, J. J. 1962. Cell wall replication in *Streptococcus pyogenes*. *Science*, 135, 722-4.
- COLLINS, M. D., WALLBANKS, S., LANE, D. J., SHAH, J., NIETUPSKI, R., SMIDA, J., DORSCH, M. & STACKEBRANDT, E. 1991. Phylogenetic analysis of the genus *Listeria* based on reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *Int J Syst Bacteriol*, 41, 240-6.
- CONSIDINE, K. M., SLEATOR, R. D., KELLY, A. L., FITZGERALD, G. F. & HILL, C. 2011. Identification and characterization of an essential gene in *Listeria monocytogenes* using an inducible gene expression system. *Bioeng Bugs*, 2, 150-9.
- CONTER, M., PALUDI, D., ZANARDI, E., GHIDINI, S., VERGARA, A. & IANIERI, A. 2009. Characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol*, 128, 497-500.
- COOPER, S. & HSIEH, M. L. 1988. The rate and topography of cell wall synthesis during the division cycle of *Escherichia coli* using N-acetylglucosamine as a peptidoglycan label. *J Gen Microbiol*, 134, 1717-21.
- COPE, G. A., SUH, G. S., ARAVIND, L., SCHWARZ, S. E., ZIPURSKY, S. L., KOONIN, E. V. & DESHAIES, R. J. 2002. Role of predicted metalloprotease motif of Jab1/Csn5 in cleavage of Nedd8 from Cul1. *Science*, 298, 608-11.
- COSSART, P. 2007. Listeriology (1926-2007): the rise of a model pathogen. *Microbes Infect*, 9, 1143-6.
- COSSART, P. & LECUIT, M. 1998. Interactions of the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* with mammalian cells: bacterial factors, cellular ligands, and signaling. *Folia Microbiol (Praha)*, 43, 291-303.
- COSSART, P. & TOLEDO-ARANA, A. 2008. *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview. *Microbes Infect*, 10, 1041-50.
- COSSART, P., VICENTE, M. F., MENGAUD, J., BAQUERO, F., PEREZ-DIAZ, J. C. & BERCHE, P. 1989. Listeriolysin O is essential for virulence of *Listeria monocytogenes*: direct evidence obtained by gene complementation. *Infect Immun*, 57, 3629-36.
- DANIEL, R. A. & ERRINGTON, J. 2000. Intrinsic instability of the essential cell division protein FtsL of *Bacillus subtilis* and a role for DivIB protein in FtsL turnover. *Mol Microbiol*, 36, 278-89.
- DANIEL, R. A. & ERRINGTON, J. 2003. Control of cell morphogenesis in bacteria: two distinct ways to make a rod-shaped cell. *Cell*, 113, 767-76.
- DANIEL, R. A., HARRY, E. J. & ERRINGTON, J. 2000. Role of penicillin-binding protein PBP 2B in assembly and functioning of the division machinery of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 35, 299-311.
- DANIEL, R. A., NOIROT-GROS, M. F., NOIROT, P. & ERRINGTON, J. 2006. Multiple interactions between the transmembrane division proteins of *Bacillus subtilis* and the role of FtsL instability in divisome assembly. *J Bacteriol*, 188, 7396-404.
- DANIEL, R. A., WILLIAMS, A. M. & ERRINGTON, J. 1996. A complex four-gene operon containing essential cell division gene *pbpB* in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 178, 2343-50.
- DAVIES, J. 1994. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science*, 264, 375-82.
- DE SMET, K. A., KEMPEL, K. E., GALLAGHER, A., DUNCAN, K. & YOUNG, D. B. 1999. Alteration of a single amino acid residue reverses fosfomycin resistance of recombinant MurA from *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology*, 145 (Pt 11), 3177-84.
- DEN BAKKER, H. C., WARCHOCKI, S., WRIGHT, E. M., ALLRED, A. F., AHLSTROM, C., MANUEL, C. S., STASIEWICZ, M. J., BURRELL, A., ROOF, S., STRAWN, L. K., FORTES, E., NIGHTINGALE, K. K., KEPHART, D. & WIEDMANN, M. 2014. *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments. *Int J Syst Evol Microbiol*, 64, 1882-9.
- DEN BLAAUWEN, T. 2013. Prokaryotic cell division: flexible and diverse. *Curr Opin Microbiol*, 16, 738-44.
- DEN BLAAUWEN, T., ANDREU, J. M. & MONASTERIO, O. 2014. Bacterial cell division proteins as antibiotic targets. *Bioorg Chem*, 55, 27-38.
- DEN BLAAUWEN, T., DE PEDRO, M. A., NGUYEN-DISTECHE, M. & AYALA, J. A. 2008. Morphogenesis of rod-shaped sacculi. *FEMS Microbiol Rev*, 32, 321-44.
- DENOME, S. A., ELF, P. K., HENDERSON, T. A., NELSON, D. E. & YOUNG, K. D. 1999. *Escherichia coli* mutants lacking all possible combinations of eight penicillin binding proteins: viability, characteristics, and implications for peptidoglycan synthesis. *J Bacteriol*, 181, 3981-93.
- DI BERARDINO, M., DIJKSTRA, A., STUBER, D., KECK, W. & GUBLER, M. 1996. The monofunctional glycosyltransferase of *Escherichia coli* is a member of a new class of peptidoglycan-synthesising enzymes. *FEBS Lett*, 392, 184-8.

- DI LALLO, G., FAGIOLI, M., BARIONOVI, D., GHELARDINI, P. & PAOLOZZI, L. 2003. Use of a two-hybrid assay to study the assembly of a complex multicomponent protein machinery: bacterial septosome differentiation. *Microbiology*, 149, 3353-9.
- DISSON, O., GRAYO, S., HUILLET, E., NIKITAS, G., LANGA-VIVES, F., DUSSURGET, O., RAGON, M., LE MONNIER, A., BABINET, C., COSSART, P. & LECUIT, M. 2008. Conjugated action of two species-specific invasion proteins for fetoplacental listeriosis. *Nature*, 455, 1114-8.
- DOI, M., WACHI, M., ISHINO, F., TOMIOKA, S., ITO, M., SAKAGAMI, Y., SUZUKI, A. & MATSUHASHI, M. 1988. Determinations of the DNA sequence of the *mreB* gene and of the gene products of the *mre* region that function in formation of the rod shape of *Escherichia coli* cells. *J Bacteriol*, 170, 4619-24.
- DOMANN, E., WEHLAND, J., ROHDE, M., PISTOR, S., HARTL, M., GOEBEL, W., LEIMEISTER-WÄCHTER, M., WUENSCHER, M. & CHAKRABORTY, T. 1992. A novel bacterial virulence gene in *Listeria monocytogenes* required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin. *EMBO J*, 11, 1981-90.
- DOMINGUEZ-ESCOBAR, J., CHASTANET, A., CREVENNA, A. H., FROMION, V., WEDLICH-SOLDNER, R. & CARBALLIDO-LOPEZ, R. 2011. Processive movement of MreB-associated cell wall biosynthetic complexes in bacteria. *Science*, 333, 225-8.
- DONOVAN, C., SIEGER, B., KRÄMER, R. & BRAMKAMP, M. 2012. A synthetic *Escherichia coli* system identifies a conserved origin tethering factor in Actinobacteria. *Mol Microbiol*, 84, 105-16.
- DOS SANTOS, V. T., BISSON-FILHO, A. W. & GUEIROS-FILHO, F. J. 2012. DivIVA-mediated polar localization of ComN, a posttranscriptional regulator of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 194, 3661-9.
- DRAMSI, S., BOURDICHON, F., CABANES, D., LECUIT, M., FSIHI, H. & COSSART, P. 2004. FbpA, a novel multifunctional *Listeria monocytogenes* virulence factor. *Mol Microbiol*, 53, 639-49.
- DREVETS, D. A. & BRONZE, M. S. 2008. *Listeria monocytogenes*: epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 53, 151-65.
- DRIEHUIS, F. & OUDE ELFERINK, S. J. 2000. The impact of the quality of silage on animal health and food safety: a review. *Vet Q*, 22, 212-6.
- DU, W., BROWN, J. R., SYLVESTER, D. R., HUANG, J., CHALKER, A. F., SO, C. Y., HOLMES, D. J., PAYNE, D. J. & WALLIS, N. G. 2000. Two active forms of UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase in Gram-positive bacteria. *J Bacteriol*, 182, 4146-52.
- DUBAIL, I., BIGOT, A., LAZAREVIC, V., SOLDI, B., EUPHRASIE, D., DUPUIS, M. & CHARBIT, A. 2006. Identification of an essential gene of *Listeria monocytogenes* involved in teichoic acid biogenesis. *J Bacteriol*, 188, 6580-91.
- DUBNAU, D. 1999. DNA uptake in bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 53, 217-44.
- DUMAN, R., ISHIKAWA, S., CELIK, I., STRAHL, H., OGASAWARA, N., TROC, P., LOWE, J. & HAMOEN, L. W. 2013. Structural and genetic analyses reveal the protein SepF as a new membrane anchor for the Z ring. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, E4601-10.
- EDWARDS, D. H. & ERRINGTON, J. 1997. The *Bacillus subtilis* DivIVA protein targets to the division septum and controls the site specificity of cell division. *Mol Microbiol*, 24, 905-15.
- EGAN, A. J. & VOLLMER, W. 2013. The physiology of bacterial cell division. *Ann N Y Acad Sci*, 1277, 8-28.
- EHLERT, K. & HÖLTJE, J. V. 1996. Role of precursor translocation in coordination of murein and phospholipid synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 178, 6766-71.
- ERRINGTON, J., DANIEL, R. A. & SCHEFFERS, D. J. 2003. Cytokinesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 67, 52-65, table of contents.
- ESCHENBURG, S., KABSCH, W., HEALY, M. L. & SCHONBRUNN, E. 2003. A new view of the mechanisms of UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase (MurA) and 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (AroA) derived from X-ray structures of their tetrahedral reaction intermediate states. *J Biol Chem*, 278, 49215-22.
- ESCHENBURG, S., PRIESTMAN, M. & SCHONBRUNN, E. 2005. Evidence that the fosfomycin target Cys115 in UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase (MurA) is essential for product release. *J Biol Chem*, 280, 3757-63.
- ESWARAMOORTHY, P., ERB, M. L., GREGORY, J. A., SILVERMAN, J., POGLIANO, K., POGLIANO, J. & RAMAMURTHI, K. S. 2011. Cellular architecture mediates DivIVA ultrastructure and regulates *min* activity in *Bacillus subtilis*. *MBio*, 2.
- ESWARAMOORTHY, P., WINTER, P. W., WAWRZUSIN, P., YORK, A. G., SHROFF, H. & RAMAMURTHI, K. S. 2014. Asymmetric division and differential gene expression during a bacterial developmental program requires DivIVA. *PLoS Genet*, 10, e1004526.
- EUGSTER, M. R., HAUG, M. C., HUWILER, S. G. & LOESSNER, M. J. 2011. The cell wall binding domain of *Listeria* bacteriophage endolysin PlyP35 recognizes terminal GlcNAc residues in cell wall teichoic acid. *Mol Microbiol*, 81, 1419-32.

- FADDA, D., PISCHEDDA, C., CALDARA, F., WHALEN, M. B., ANDERLUZZI, D., DOMENICI, E. & MASSIDDA, O. 2003. Characterization of *divIVA* and other genes located in the chromosomal region downstream of the *dcw* cluster in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol*, 185, 6209-14.
- FADDA, D., SANTONA, A., D'ULISSE, V., GHELARDINI, P., ENNAS, M. G., WHALEN, M. B. & MASSIDDA, O. 2007. *Streptococcus pneumoniae* DivIVA: localization and interactions in a MinCD-free context. *J Bacteriol*, 189, 1288-98.
- FAITH, N., KATHARIOU, S., CHENG, Y., PROMADEJ, N., NEUDECK, B. L., ZHANG, Q., LUCHANSKY, J. & CZUPRYNSKI, C. 2009. The role of *L. monocytogenes* serotype 4b *gtcA* in gastrointestinal listeriosis in A/J mice. *Foodborne Pathog Dis*, 6, 39-48.
- FELZENSZWALB, I., SARGENTINI, N. J. & SMITH, K. C. 1984. Characterization of a new radiation-sensitive mutant, *Escherichia coli* K-12 *radC102*. *Radiat Res*, 97, 615-25.
- FEUCHT, A., MAGNIN, T., YUDKIN, M. D. & ERRINGTON, J. 1996. Bifunctional protein required for asymmetric cell division and cell-specific transcription in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev*, 10, 794-803.
- FIGGE, R. M., DIVAKARUNI, A. V. & GOBER, J. W. 2004. MreB, the cell shape-determining bacterial actin homologue, co-ordinates cell wall morphogenesis in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol*, 51, 1321-32.
- FINBERG, R. W., MOELLERING, R. C., TALLY, F. P., CRAIG, W. A., PANKEY, G. A., DELLINGER, E. P., WEST, M. A., JOSHI, M., LINDEN, P. K., ROLSTON, K. V., ROTSCHAFER, J. C. & RYBAK, M. J. 2004. The Importance of Bactericidal Drugs: Future Directions in Infectious Disease. *Clinical Infectious Diseases*, 39, 1314-1320.
- FISCHER, W. 1988. Physiology of lipoteichoic acids in bacteria. *Adv Microb Physiol*, 29, 233-302.
- FISCHER, W., KOCH, H. U., ROSEL, P. & FIEDLER, F. 1980. Alanine ester-containing native lipoteichoic acids do not act as lipoteichoic acid carrier. Isolation, structural and functional characterization. *J Biol Chem*, 255, 4557-62.
- FISCHER, W., MANNSFELD, T. & HAGEN, G. 1990. On the basic structure of poly(glycerophosphate) lipoteichoic acids. *Biochem Cell Biol*, 68, 33-43.
- FLÄRDH, K. 2003. Essential role of DivIVA in polar growth and morphogenesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol*, 49, 1523-36.
- FLEURIE, A., CLUZEL, C., GUIRAL, S., FRETON, C., GALISSON, F., ZANELLA-CLEON, I., DI GUILMI, A. M. & GRANGEASSE, C. 2012. Mutational dissection of the S/T-kinase StkP reveals crucial roles in cell division of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol*, 83, 746-58.
- FLEURIE, A., MANUSE, S., ZHAO, C., CAMPO, N., CLUZEL, C., LAVERGNE, J. P., FRETON, C., COMBET, C., GUIRAL, S., SOUFI, B., MACEK, B., KURU, E., VANNIEUWENHZE, M. S., BRUN, Y. V., DI GUILMI, A. M., CLAVERY, J. P., GALINIER, A. & GRANGEASSE, C. 2014. Interplay of the serine/threonine-kinase StkP and the paralogs DivIVA and GpsB in pneumococcal cell elongation and division. *PLoS Genet*, 10, e1004275.
- FORMSTONE, A. & ERRINGTON, J. 2005. A magnesium-dependent *mreB* null mutant: implications for the role of *mreB* in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 55, 1646-57.
- FOWLER, T., WANN, E. R., JOH, D., JOHANSSON, S., FOSTER, T. J. & HOOK, M. 2000. Cellular invasion by *Staphylococcus aureus* involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell beta1 integrins. *Eur J Cell Biol*, 79, 672-9.
- FREES, D., GERTH, U. & INGMER, H. 2014. Clp chaperones and proteases are central in stress survival, virulence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol*, 304, 142-9.
- FREITAG, N. E., PORT, G. C. & MINER, M. D. 2009. *Listeria monocytogenes* - from saprophyte to intracellular pathogen. *Nat Rev Microbiol*, 7, 623-8.
- GAILLARD, J. L., BERCHE, P., FREHEL, C., GOUIN, E. & COSSART, P. 1991. Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from Gram-positive cocci. *Cell*, 65, 1127-41.
- GAMBA, P., VEENING, J. W., SAUNDERS, N. J., HAMOEN, L. W. & DANIEL, R. A. 2009. Two-step assembly dynamics of the *Bacillus subtilis* divisome. *J Bacteriol*, 191, 4186-94.
- GAN, L., CHEN, S. & JENSEN, G. J. 2008. Molecular organization of Gram-negative peptidoglycan. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 18953-7.
- GANDHI, M. & CHIKINDAS, M. L. 2007. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *Int J Food Microbiol*, 113, 1-15.
- GARNER, E. C., BERNARD, R., WANG, W., ZHUANG, X., RUDNER, D. Z. & MITCHISON, T. 2011. Coupled, circumferential motions of the cell wall synthesis machinery and MreB filaments in *B. subtilis*. *Science*, 333, 222-5.
- GHOLAMHOSEINIAN, A., SHEN, Z., WU, J. J. & PIGGOT, P. 1992. Regulation of transcription of the cell division gene *ftsA* during sporulation of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 174, 4647-56.
- GHUYSEN, J. M. 1968. Use of bacteriolytic enzymes in determination of wall structure and their role in cell metabolism. *Bacteriol Rev*, 32, 425-64.
- GHUYSEN, J. M. 1991. Serine beta-lactamases and penicillin-binding proteins. *Annu Rev Microbiol*, 45, 37-67.

- GIEFING-KROLL, C., JELENCICS, K. E., REIPERT, S. & NAGY, E. 2011. Absence of pneumococcal PcsB is associated with overexpression of LysM domain-containing proteins. *Microbiology*, 157, 1897-909.
- GILOT, P., ANDRE, P. & CONTENT, J. 1999. *Listeria monocytogenes* possesses adhesins for fibronectin. *Infect Immun*, 67, 6698-701.
- GLASER, P., FRANGEUL, L., BUCHRIESER, C., RUSNIOK, C., AMEND, A., BAQUERO, F., BERCHE, P., BLOECKER, H., BRANDT, P., CHAKRABORTY, T., CHARBIT, A., CHETOUANI, F., COUVE, E., DE DARUVAR, A., DEHOUX, P., DOMANN, E., DOMINGUEZ-BERNAL, G., DUCHAUD, E., DURANT, L., DUSSURGET, O., ENTIAN, K. D., FSIHI, H., GARCIA-DEL PORTILLO, F., GARRIDO, P., GAUTIER, L., GOEBEL, W., GOMEZ-LOPEZ, N., HAIN, T., HAUF, J., JACKSON, D., JONES, L. M., KAERST, U., KREFT, J., KUHN, M., KUNST, F., KURAPKAT, G., MADUENO, E., MAITOURNAM, A., VICENTE, J. M., NG, E., NEDJARI, H., NORDSIEK, G., NOVELLA, S., DE PABLOS, B., PEREZ-DIAZ, J. C., PURCELL, R., REMMEL, B., ROSE, M., SCHLUETER, T., SIMOES, N., TIERREZ, A., VAZQUEZ-BOLAND, J. A., VOSS, H., WEHLAND, J. & COSSART, P. 2001. Comparative genomics of *Listeria* species. *Science*, 294, 849-52.
- GOFFIN, C. & GHUYSEN, J. M. 1998. Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62, 1079-93.
- GONZALEZ-LEIZA, S. M., DE PEDRO, M. A. & AYALA, J. A. 2011. AmpH, a bifunctional DD-endopeptidase and DD-carboxypeptidase of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 193, 6887-94.
- GONZY-TREBOUL, G., KARMAZYN-CAMPELLI, C. & STRAGIER, P. 1992. Developmental regulation of transcription of the *Bacillus subtilis* ftsAZ operon. *J Mol Biol*, 224, 967-79.
- GORDON, R. C., BARRETT, F. F. & CLARK, D. J. 1972. Influence of several antibiotics, singly and in combination, on the growth of *Listeria monocytogenes*. *J Pediatr*, 80, 667-70.
- GOTTESMAN, S. & MAURIZI, M. R. 1992. Regulation by proteolysis: energy-dependent proteases and their targets. *Microbiol Rev*, 56, 592-621.
- GOTTESMAN, S., WICKNER, S. & MAURIZI, M. R. 1997. Protein quality control: triage by chaperones and proteases. *Genes Dev*, 11, 815-23.
- GRAVES, L. M., HELSEL, L. O., STEIGERWALT, A. G., MOREY, R. E., DANESHVAR, M. I., ROOF, S. E., ORSI, R. H., FORTES, E. D., MILILLO, S. R., DEN BAKKER, H. C., WIEDMANN, M., SWAMINATHAN, B. & SAUDERS, B. D. 2010. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *Int J Syst Evol Microbiol*, 60, 1280-8.
- GRAY, M. L. & KILLINGER, A. H. 1966. *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriol Rev*, 30, 309-82.
- GRAY, M. L., SINGH, C. & THORP, F., JR. 1955. Abortion, stillbirth, early death of young in rabbits by *Listeria monocytogenes*. I. Ocular instillation. *Proc Soc Exp Biol Med*, 89, 163-9.
- GUEIROS-FILHO, F. J. & LOSICK, R. 2002. A widely conserved bacterial cell division protein that promotes assembly of the tubulin-like protein FtsZ. *Genes Dev*, 16, 2544-56.
- GUINANE, C. M., COTTER, P. D., ROSS, R. P. & HILL, C. 2006. Contribution of penicillin-binding protein homologs to antibiotic resistance, cell morphology, and virulence of *Listeria monocytogenes* EGDe. *Antimicrob Agents Chemother*, 50, 2824-8.
- GUTKIND, G. O., OGUETA, S. B., DE URTIAGA, A. C., MOLLERACH, M. E. & DE TORRES, R. A. 1990. Participation of PBP 3 in the acquisition of dicloxacillin resistance in *Listeria monocytogenes*. *J Antimicrob Chemother*, 25, 751-8.
- HAEUSSER, D. P., SCHWARTZ, R. L., SMITH, A. M., OATES, M. E. & LEVIN, P. A. 2004. EzrA prevents aberrant cell division by modulating assembly of the cytoskeletal protein FtsZ. *Mol Microbiol*, 52, 801-14.
- HALAVATI, A. S., MINASOV, G., SHUVALOVA, L., DUBROVSKA, I., WINSOR, J., PETERSON, S. & ANDERSON, W. F. unpublished. 2.23 Angstrom resolution crystal structure of UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase (MurA) from *Listeria monocytogenes* EGD-e
- HALBEDEL, S., HAHN, B., DANIEL, R. A. & FLIEGER, A. 2012. DivIVA affects secretion of virulence-related autolysins in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol*, 83, 821-39.
- HALE, C. A. & DE BOER, P. A. 2002. ZipA is required for recruitment of FtsK, FtsQ, FtsL, and FtsN to the septal ring in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 184, 2552-6.
- HAMOEN, L. W., MEILE, J. C., DE JONG, W., NOIROT, P. & ERRINGTON, J. 2006. SepF, a novel FtsZ-interacting protein required for a late step in cell division. *Mol Microbiol*, 59, 989-99.
- HAMON, M., BIERNE, H. & COSSART, P. 2006. *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. *Nat Rev Microbiol*, 4, 423-34.
- HAN, H., YANG, Y., OLESEN, S. H., BECKER, A., BETZI, S. & SCHONBRUNN, E. 2010. The fungal product terreic acid is a covalent inhibitor of the bacterial cell wall biosynthetic enzyme UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase (MurA). *Biochemistry*, 49, 4276-82.
- HANSEN, J. M., GERNER-SMIDT, P. & BRUUN, B. 2005. Antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* in Denmark 1958-2001. *APMIS*, 113, 31-6.

- HARA, H. & SUZUKI, H. 1984. A novel glycan polymerase that synthesizes uncross-linked peptidoglycan in *Escherichia coli*. *FEBS Lett*, 168, 155-60.
- HARRY, E. J. & LEWIS, P. J. 2003. Early targeting of Min proteins to the cell poles in germinated spores of *Bacillus subtilis*: evidence for division apparatus-independent recruitment of Min proteins to the division site. *Mol Microbiol*, 47, 37-48.
- HAYDON, D. J., STOKES, N. R., URE, R., GALBRAITH, G., BENNETT, J. M., BROWN, D. R., BAKER, P. J., BARYNIN, V. V., RICE, D. W., SEDELNIKOVA, S. E., HEAL, J. R., SHERIDAN, J. M., AIWALE, S. T., CHAUHAN, P. K., SRIVASTAVA, A., TANEJA, A., COLLINS, I., ERRINGTON, J. & CZAPLEWSKI, L. G. 2008. An inhibitor of FtsZ with potent and selective anti-staphylococcal activity. *Science*, 321, 1673-5.
- HEGER, W., DIERICH, M. P. & ALLERBERGER, F. 1997. *In vitro* susceptibility of *Listeria monocytogenes*: comparison of the E test with the agar dilution test. *Chemotherapy*, 43, 303-10.
- HEPOWIT, N. L., UTHANDI, S., MIRANDA, H. V., TONIUTTI, M., PRUNETTI, L., OLIVAREZ, O., DE VERA, I. M., FANUCCI, G. E., CHEN, S. & MAUPIN-FURLOW, J. A. 2012. Archaeal JAB1/MPN/MOV34 metalloenzyme (HvJAMM1) cleaves ubiquitin-like small archaeal modifier proteins (SAMPs) from protein-conjugates. *Mol Microbiol*, 86, 971-87.
- HIGASHI, Y., STROMINGER, J. L. & SWEETLEY, C. C. 1967. Structure of a lipid intermediate in cell wall peptidoglycan synthesis: a derivative of a C55 isoprenoid alcohol. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 57, 1878-84.
- HIGGINS, M. L. & SHOCKMAN, G. D. 1976. Study of cycle of cell wall assembly in *Streptococcus faecalis* by three-dimensional reconstructions of thin sections of cells. *J Bacteriol*, 127, 1346-58.
- HINNERWISCH, J., FENTON, W. A., FURTAK, K. J., FARR, G. W. & HORWICH, A. L. 2005. Loops in the central channel of ClpA chaperone mediate protein binding, unfolding, and translocation. *Cell*, 121, 1029-41.
- HOF, H. 2003. Listeriosis: therapeutic options. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 35, 203-5.
- HOF, H. 2004. An update on the medical management of listeriosis. *Expert Opin Pharmacother*, 5, 1727-35.
- HÖLTJE, J. V. 1998. Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62, 181-203.
- HOSKINS, J., MATSUSHIMA, P., MULLEN, D. L., TANG, J., ZHAO, G., MEIER, T. I., NICAS, T. I. & JASKUNAS, S. R. 1999. Gene disruption studies of penicillin-binding proteins 1a, 1b, and 2a in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol*, 181, 6552-5.
- HUBER, G. & NESEMAN, G. 1968. Moenomycin, an inhibitor of cell wall synthesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 30, 7-13.
- HUSSAIN, M., HEILMANN, C., PETERS, G. & HERRMANN, M. 2001. Teichoic acid enhances adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to immobilized fibronectin. *Microb Pathog*, 31, 261-70.
- ISHINO, F. & MATSUHASHI, M. 1981. Peptidoglycan synthetic enzyme activities of highly purified penicillin-binding protein 3 in *Escherichia coli*: a septum-forming reaction sequence. *Biochem Biophys Res Commun*, 101, 905-11.
- ISHINO, F., PARK, W., TOMIOKA, S., TAMAKI, S., TAKASE, I., KUNUGITA, K., MATSUZAWA, H., ASOH, S., OHTA, T., SPRATT, B. G. & ET AL. 1986. Peptidoglycan synthetic activities in membranes of *Escherichia coli* caused by overproduction of penicillin-binding protein 2 and RodA protein. *J Biol Chem*, 261, 7024-31.
- ITO, T. 2014. PAMPs and DAMPs as triggers for DIC. *J Intensive Care*, 2, 67.
- IYER, L. M., BURROUGHS, A. M. & ARAVIND, L. 2006. The prokaryotic antecedents of the ubiquitin-signaling system and the early evolution of ubiquitin-like beta-grasp domains. *Genome Biol*, 7, R60.
- IZAKI, K. & STROMINGER, J. L. 1968. Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. XIV. Purification and properties of two D-alanine carboxypeptidases from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 243, 3193-201.
- JENSEN, S. O., THOMPSON, L. S. & HARRY, E. J. 2005. Cell division in *Bacillus subtilis*: FtsZ and FtsA association is Z-ring independent, and FtsA is required for efficient midcell Z-Ring assembly. *J Bacteriol*, 187, 6536-44.
- JEONG, J. H., KIM, Y. S., ROJVIRIYA, C., HA, S. C., KANG, B. S. & KIM, Y. G. 2013. Crystal structures of bifunctional penicillin-binding protein 4 from *Listeria monocytogenes*. *Antimicrob Agents Chemother*, 57, 3507-12.
- JOHANSSON, J., MANDIN, P., RENZONI, A., CHIARUTTINI, C., SPRINGER, M. & COSSART, P. 2002. An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Cell*, 110, 551-61.
- JONES, E. M. & MACGOWAN, A. P. 1995. Antimicrobial chemotherapy of human infection due to *Listeria monocytogenes*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 14, 165-75.
- JONES, L. J., CARBALLIDO-LOPEZ, R. & ERRINGTON, J. 2001. Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell*, 104, 913-22.

- JONQUIERES, R., BIERNE, H., FIEDLER, F., GOUNON, P. & COSSART, P. 1999. Interaction between the protein InlB of *Listeria monocytogenes* and lipoteichoic acid: a novel mechanism of protein association at the surface of Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol*, 34, 902-14.
- JONQUIERES, R., PIZARRO-CERDA, J. & COSSART, P. 2001. Synergy between the N- and C-terminal domains of InlB for efficient invasion of non-phagocytic cells by *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol*, 42, 955-65.
- KAHAN, F. M., KAHAN, J. S., CASSIDY, P. J. & KROPP, H. 1974. The mechanism of action of fosfomycin (phosphonomycin). *Ann N Y Acad Sci*, 235, 364-86.
- KAMMERER, R. A., KOSTREWA, D., PROGIAS, P., HONNAPPA, S., AVILA, D., LUSTIG, A., WINKLER, F. K., PIETERS, J. & STEINMETZ, M. O. 2005. A conserved trimerization motif controls the topology of short coiled coils. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 13891-6.
- KANG, C. M., NYAYAPATHY, S., LEE, J. Y., SUH, J. W. & HUSSON, R. N. 2008. Wag31, a homologue of the cell division protein DivIVA, regulates growth, morphology and polar cell wall synthesis in *Mycobacteria*. *Microbiology*, 154, 725-35.
- KARIMOVA, G., DAUTIN, N. & LADANT, D. 2005. Interaction network among *Escherichia coli* membrane proteins involved in cell division as revealed by bacterial two-hybrid analysis. *J Bacteriol*, 187, 2233-43.
- KARIMOVA, G., PIDOUX, J., ULLMANN, A. & LADANT, D. 1998. A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 5752-6.
- KAVAL, K. G., RISMONDO, J. & HALBEDEL, S. 2014. A function of DivIVA in *Listeria monocytogenes* division site selection. *Mol Microbiol*, 94, 637-54.
- KAWAI, Y. & OGASAWARA, N. 2006. *Bacillus subtilis* EzrA and FtsL synergistically regulate FtsZ ring dynamics during cell division. *Microbiology*, 152, 1129-41.
- KEDAR, G. C., BROWN-DRIVER, V., REYES, D. R., HILGERS, M. T., STIDHAM, M. A., SHAW, K. J., FINN, J. & HASELBECK, R. J. 2008. Comparison of the essential cellular functions of the two *murA* genes of *Bacillus anthracis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 52, 2009-13.
- KHVOROVA, A., ZHANG, L., HIGGINS, M. L. & PIGGOT, P. J. 1998. The *spoIIIE* locus is involved in the Spo0A-dependent switch in the location of FtsZ rings in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 180, 1256-60.
- KIBBE, W. A. 2007. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res*, 35, W43-6.
- KIM, D. H., LEES, W. J., KEMPESELL, K. E., LANE, W. S., DUNCAN, K. & WALSH, C. T. 1996. Characterization of a Cys115 to Asp substitution in the *Escherichia coli* cell wall biosynthetic enzyme UDP-GlcNAc enolpyruvyl transferase (MurA) that confers resistance to inactivation by the antibiotic fosfomycin. *Biochemistry*, 35, 4923-8.
- KIRSTEIN, J., SCHLOTHAUER, T., DOUGAN, D. A., LILIE, H., TISCHENDORF, G., MOGK, A., BUKAU, B. & TURGAY, K. 2006. Adaptor protein controlled oligomerization activates the AAA+ protein ClpC. *EMBO J*, 25, 1481-91.
- KOBAYASHI, K., EHRLICH, S. D., ALBERTINI, A., AMATI, G., ANDERSEN, K. K., ARNAUD, M., ASAI, K., ASHIKAGA, S., AYMERICH, S., BESSIERES, P., BOLAND, F., BRIGNELL, S. C., BRON, S., BUNAI, K., CHAPUIS, J., CHRISTIANSEN, L. C., DANCHIN, A., DEBARBOUILLE, M., DERYN, E., DEUERLING, E., DEVINE, K., DEVINE, S. K., DRESEN, O., ERRINGTON, J., FILLINGER, S., FOSTER, S. J., FUJITA, Y., GALIZZI, A., GARDAN, R., ESCHEVINS, C., FUKUSHIMA, T., HAGA, K., HARWOOD, C. R., HECKER, M., HOSOYA, D., HULLO, M. F., KAKESHITA, H., KARAMATA, D., KASAHARA, Y., KAWAMURA, F., KOGA, K., KOSKI, P., KUWANA, R., IMAMURA, D., ISHIMARU, M., ISHIKAWA, S., ISHIO, I., LE COQ, D., MASSON, A., MAUEL, C., MEIMA, R., MELLADO, R. P., MOIR, A., MORIYA, S., NAGAKAWA, E., NANAMIYA, H., NAKAI, S., NYGAARD, P., OGURA, M., OHANAN, T., O'REILLY, M., O'ROURKE, M., PRAGAI, Z., POOLEY, H. M., RAPOPORT, G., RAWLINS, J. P., RIVAS, L. A., RIVOLTA, C., SADAIE, A., SADAIE, Y., SARVAS, M., SATO, T., SAXILD, H. H., SCANLAN, E., SCHUMANN, W., SEEGER, J. F., SEKIGUCHI, J., SEKOWSKA, A., SEROR, S. J., SIMON, M., STRAGIER, P., STUDER, R., TAKAMATSU, H., TANAKA, T., TAKEUCHI, M., THOMAIDES, H. B., VAGNER, V., VAN DIJL, J. M., WATABE, K., WIPAT, A., YAMAMOTO, H., YAMAMOTO, M., YAMAMOTO, Y., YAMANE, K., YATA, K., YOSHIDA, K., YOSHIKAWA, H., ZUBER, U. & OGASAWARA, N. 2003. Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 4678-83.
- KOCAOGLU, O., CALVO, R. A., SHAM, L. T., COZY, L. M., LANNING, B. R., FRANCIS, S., WINKLER, M. E., KEARNS, D. B. & CARLSON, E. E. 2012. Selective penicillin-binding protein imaging probes reveal substructure in bacterial cell division. *ACS Chem Biol*, 7, 1746-53.
- KOCH, A. L. 2000. Length distribution of the peptidoglycan chains in the sacculus of *Escherichia coli*. *J Theor Biol*, 204, 533-41.
- KOCH, J. & STARK, K. 2006. Significant increase of listeriosis in Germany--epidemiological patterns 2001-2005. *Euro Surveill*, 11, 85-8.
- KOCK, H., GERTH, U. & HECKER, M. 2004. MurAA, catalysing the first committed step in peptidoglycan biosynthesis, is a target of Clp-dependent proteolysis in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 51, 1087-102.

- KOCKS, C., GOUIN, E., TABOURET, M., BERCHE, P., OHAYON, H. & COSSART, P. 1992. *L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the *actA* gene product, a surface protein. *Cell*, 68, 521-31.
- KOCKS, C., HELLIO, R., GOUNON, P., OHAYON, H. & COSSART, P. 1993. Polarized distribution of *Listeria monocytogenes* surface protein ActA at the site of directional actin assembly. *J Cell Sci*, 105 (Pt 3), 699-710.
- KOHLRAUSCH, U. & HÖLTJE, J. V. 1991. Analysis of murein and murein precursors during antibiotic-induced lysis of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 173, 3425-31.
- KOLB-MAURER, A., GENTSCHKEV, I., FRIES, H. W., FIEDLER, F., BROCKER, E. B., KAMPGEN, E. & GOEBEL, W. 2000. *Listeria monocytogenes*-infected human dendritic cells: uptake and host cell response. *Infect Immun*, 68, 3680-8.
- KORSAK, D., MARKIEWICZ, Z., GUTKIND, G. O. & AYALA, J. A. 2010. Identification of the full set of *Listeria monocytogenes* penicillin-binding proteins and characterization of PBPD2 (Lmo2812). *BMC Microbiol*, 10, 239.
- KRAWCZYK-BALSKA, A., POPOWSKA, M. & MARKIEWICZ, Z. 2012. Re-evaluation of the significance of penicillin binding protein 3 in the susceptibility of *Listeria monocytogenes* to beta-lactam antibiotics. *BMC Microbiol*, 12, 57.
- KRÜGER, E., VÖLKER, U. & HECKER, M. 1994. Stress induction of *clpC* in *Bacillus subtilis* and its involvement in stress tolerance. *J Bacteriol*, 176, 3360-7.
- KRÜGER, E., ZÜHLKE, D., WITT, E., LUDWIG, H. & HECKER, M. 2001. Clp-mediated proteolysis in Gram-positive bacteria is autoregulated by the stability of a repressor. *EMBO J*, 20, 852-63.
- KRUSE, T., BORK-JENSEN, J. & GERDES, K. 2005. The morphogenetic MreBCD proteins of *Escherichia coli* form an essential membrane-bound complex. *Mol Microbiol*, 55, 78-89.
- KUHN, M. & GOEBEL, W. 1989. Identification of an extracellular protein of *Listeria monocytogenes* possibly involved in intracellular uptake by mammalian cells. *Infect Immun*, 57, 55-61.
- LABISCHINSKI, H., BARNICKEL, G., NAUMANN, D. & KELLER, P. 1985. Conformational and topological aspects of the three-dimensional architecture of bacterial peptidoglycan. *Ann Inst Pasteur Microbiol*, 136A, 45-50.
- LADANT, D. & ULLMANN, A. 1999. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Trends Microbiol*, 7, 172-6.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- LAMPIDIS, R., KOSTREWA, D. & HOF, H. 2002. Molecular characterization of the genes encoding DNA gyrase and topoisomerase IV of *Listeria monocytogenes*. *J Antimicrob Chemother*, 49, 917-24.
- LAND, A. D., TSUI, H. C., KOCAOGLU, O., VELLA, S. A., SHAW, S. L., KEEN, S. K., SHAM, L. T., CARLSON, E. E. & WINKLER, M. E. 2013. Requirement of essential Pbp2x and GpsB for septal ring closure in *Streptococcus pneumoniae* D39. *Mol Microbiol*, 90, 939-55.
- LAND, A. D. & WINKLER, M. E. 2011. The requirement for pneumococcal MreC and MreD is relieved by inactivation of the gene encoding PBP1a. *J Bacteriol*, 193, 4166-79.
- LANG HALTER, E., NEUHAUS, K. & SCHERER, S. 2013. *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. *Int J Syst Evol Microbiol*, 63, 641-7.
- LEAVER, M. & ERRINGTON, J. 2005. Roles for MreC and MreD proteins in helical growth of the cylindrical cell wall in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 57, 1196-209.
- LEBAR, M. D., LUPOLI, T. J., TSUKAMOTO, H., MAY, J. M., WALKER, S. & KAHNE, D. 2013. Forming cross-linked peptidoglycan from synthetic Gram-negative Lipid II. *J Am Chem Soc*, 135, 4632-5.
- LEBRUN, M., MENGAUD, J., OHAYON, H., NATO, F. & COSSART, P. 1996. Internalin must be on the bacterial surface to mediate entry of *Listeria monocytogenes* into epithelial cells. *Mol Microbiol*, 21, 579-92.
- LECLERCQ, A., CLERMONT, D., BIZET, C., GRIMONT, P. A., LE FLECHE-MATEOS, A., ROCHE, S. M., BUCHRIESER, C., CADET-DANIEL, V., LE MONNIER, A., LECUIT, M. & ALLERBERGER, F. 2010. *Listeria rocourtiae* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 60, 2210-4.
- LECUIT, M. 2005. Understanding how *Listeria monocytogenes* targets and crosses host barriers. *Clin Microbiol Infect*, 11, 430-6.
- LECUIT, M. 2007. Human listeriosis and animal models. *Microbes Infect*, 9, 1216-25.
- LECUIT, M., DRAMSI, S., GOTTARDI, C., FEDOR-CHAIKEN, M., GUMBINER, B. & COSSART, P. 1999. A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *EMBO J*, 18, 3956-63.
- LECUIT, M., VANDORMAEL-POURNIN, S., LEFORT, J., HUERRE, M., GOUNON, P., DUPUY, C., BABINET, C. & COSSART, P. 2001. A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. *Science*, 292, 1722-5.
- LEDERBERG, J. 1957. Mechanism of action of penicillin. *J Bacteriol*, 73, 144.

- LEE, J. C. & STEWART, G. C. 2003. Essential nature of the *mreC* determinant of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 185, 4490-8.
- LEE, M., HESEK, D., SUVOROV, M., LEE, W., VAKULENKO, S. & MOBASHERY, S. 2003. A mechanism-based inhibitor targeting the DD-transpeptidase activity of bacterial penicillin-binding proteins. *J Am Chem Soc*, 125, 16322-6.
- LEE, W., MCDONOUGH, M. A., KOTRA, L., LI, Z. H., SILVAGGI, N. R., TAKEDA, Y., KELLY, J. A. & MOBASHERY, S. 2001. A 1.2-Å snapshot of the final step of bacterial cell wall biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 1427-31.
- LENARCIC, R., HALBEDEL, S., VISSER, L., SHAW, M., WU, L. J., ERRINGTON, J., MARENDUZZO, D. & HAMOEN, L. W. 2009. Localisation of DivIVA by targeting to negatively curved membranes. *EMBO J*, 28, 2272-82.
- LENZ, L. L., MOHAMMADI, S., GEISLER, A. & PORTNOY, D. A. 2003. SecA2-dependent secretion of autolytic enzymes promotes *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 12432-7.
- LENZ, L. L. & PORTNOY, D. A. 2002. Identification of a second *Listeria secA* gene associated with protein secretion and the rough phenotype. *Mol Microbiol*, 45, 1043-56.
- LETEK, M., ORDONEZ, E., VAQUERA, J., MARGOLIN, W., FLÄRDH, K., MATEOS, L. M. & GIL, J. A. 2008. DivIVA is required for polar growth in the MreB-lacking rod-shaped actinomycete *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol*, 190, 3283-92.
- LEVIN, P. A., KURTSE, I. G. & GROSSMAN, A. D. 1999. Identification and characterization of a negative regulator of FtsZ ring formation in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 9642-7.
- LEVIN, P. A., MARGOLIS, P. S., SETLOW, P., LOSICK, R. & SUN, D. 1992. Identification of *Bacillus subtilis* genes for septum placement and shape determination. *J Bacteriol*, 174, 6717-28.
- LEVIN, P. A., SCHWARTZ, R. L. & GROSSMAN, A. D. 2001. Polymer stability plays an important role in the positional regulation of FtsZ. *J Bacteriol*, 183, 5449-52.
- LIU, H. & NAISMITH, J. H. 2008. An efficient one-step site-directed deletion, insertion, single and multiple-site plasmid mutagenesis protocol. *BMC Biotechnol*, 8, 91.
- LIVERMORE, D. M. 2003. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clin Infect Dis*, 36, S11-23.
- LLEO, M. M., CANEPARI, P. & SATTA, G. 1990. Bacterial cell shape regulation: testing of additional predictions unique to the two-competing-sites model for peptidoglycan assembly and isolation of conditional rod-shaped mutants from some wild-type cocci. *J Bacteriol*, 172, 3758-71.
- LOMBARDO, M. J. & ROSENBERG, S. M. 2000. *radC102* of *Escherichia coli* is an allele of *recG*. *J Bacteriol*, 182, 6287-91.
- LOOSE, M. & MITCHISON, T. J. 2014. The bacterial cell division proteins FtsA and FtsZ self-organize into dynamic cytoskeletal patterns. *Nat Cell Biol*, 16, 38-46.
- LORBER, B. 1997. Listeriosis. *Clin Infect Dis*, 24, 1-9; quiz 10-1.
- LOVERING, A. L., DE CASTRO, L. H., LIM, D. & STRYNADKA, N. C. 2007. Structural insight into the transglycosylation step of bacterial cell-wall biosynthesis. *Science*, 315, 1402-5.
- LOW, J. C. & DONACHIE, W. 1997. A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. *Vet J*, 153, 9-29.
- LYAPINA, S., COPE, G., SHEVCHENKO, A., SERINO, G., TSUGE, T., ZHOU, C., WOLF, D. A., WEI, N., SHEVCHENKO, A. & DESHAIES, R. J. 2001. Promotion of NEDD-CUL1 conjugate cleavage by COP9 signalosome. *Science*, 292, 1382-5.
- MACEK, B., MIJAKOVIC, I., OLSEN, J. V., GNAD, F., KUMAR, C., JENSEN, P. R. & MANN, M. 2007. The serine/threonine/tyrosine phosphoproteome of the model bacterium *Bacillus subtilis*. *Mol Cell Proteomics*, 6, 697-707.
- MACHATA, S., HAIN, T., ROHDE, M. & CHAKRABORTY, T. 2005. Simultaneous deficiency of both MurA and p60 proteins generates a rough phenotype in *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol*, 187, 8385-94.
- MACHEBOEUF, P., CONTRERAS-MARTEL, C., JOB, V., DIDEBERG, O. & DESSEN, A. 2006. Penicillin binding proteins: key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes. *FEMS Microbiol Rev*, 30, 673-91.
- MACKANESS, G. B. 1962. Cellular resistance to infection. *J Exp Med*, 116, 381-406.
- MANDEL, M. & HIGA, A. 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol*, 53, 159-62.
- MARGET, W. & SEELIGER, H. P. 1988. *Listeria monocytogenes* infections--therapeutic possibilities and problems. *Infection*, 16 Suppl 2, S175-7.
- MARGOLIN, W. 2001. Bacterial cell division: a moving MinE sweeper boggles the MinD. *Curr Biol*, 11, R395-8.
- MARQUARDT, J. L., BROWN, E. D., LANE, W. S., HALEY, T. M., ICHIKAWA, Y., WONG, C. H. & WALSH, C. T. 1994. Kinetics, stoichiometry, and identification of the reactive thiolate in the inactivation of UDP-GlcNAc enolpyruvoyl transferase by the antibiotic fosfomycin. *Biochemistry*, 33, 10646-51.
- MARQUIS, H. 2006. Tissue culture cell assays used to analyze *Listeria monocytogenes*. *Curr Protoc Microbiol*, Chapter 9, Unit 9B 4.

- MARRAFFINI, L. A., DEDENT, A. C. & SCHNEEWIND, O. 2006. Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of Gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 70, 192-221.
- MARSTON, A. L. & ERRINGTON, J. 1999. Selection of the midcell division site in *Bacillus subtilis* through MinD-dependent polar localization and activation of MinC. *Mol Microbiol*, 33, 84-96.
- MARSTON, A. L., THOMAIDES, H. B., EDWARDS, D. H., SHARPE, M. E. & ERRINGTON, J. 1998. Polar localization of the MinD protein of *Bacillus subtilis* and its role in selection of the mid-cell division site. *Genes Dev*, 12, 3419-30.
- MASSIDDA, O., ANDERLUZZI, D., FRIEDLI, L. & FEGER, G. 1998. Unconventional organization of the division and cell wall gene cluster of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology*, 144 (Pt 11), 3069-78.
- MASSIDDA, O., NOVAKOVA, L. & VOLLMER, W. 2013. From models to pathogens: how much have we learned about *Streptococcus pneumoniae* cell division? *Environ Microbiol*, 15, 3133-57.
- MASSON, S., KERN, T., LE GOUELLEC, A., GIUSTINI, C., SIMORRE, J. P., CALLOW, P., VERNET, T., GABEL, F. & ZAPUN, A. 2009. Central domain of DivIB caps the C-terminal regions of the FtsL/DivIC coiled-coil rod. *J Biol Chem*, 284, 27687-700.
- MASSOVA, I. & MOBASHERY, S. 1998. Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 42, 1-17.
- MATSUHASHI, M., WACHI, M. & ISHINO, F. 1990. Machinery for cell growth and division: penicillin-binding proteins and other proteins. *Res Microbiol*, 141, 89-103.
- MCCALLUM, N., MEIER, P. S., HEUSSER, R. & BERGER-BACHI, B. 2011. Mutational analyses of open reading frames within the *vraSR* operon and their roles in the cell wall stress response of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 55, 1391-402.
- MCMANUS, P. S., STOCKWELL, V. O., SUNDIN, G. W. & JONES, A. L. 2002. Antibiotic use in plant agriculture. *Annu Rev Phytopathol*, 40, 443-65.
- MCPHERSON, D. C., DRIKS, A. & POPHAM, D. L. 2001. Two class A high-molecular-weight penicillin-binding proteins of *Bacillus subtilis* play redundant roles in sporulation. *J Bacteriol*, 183, 6046-53.
- MCPHERSON, D. C. & POPHAM, D. L. 2003. Peptidoglycan synthesis in the absence of class A penicillin-binding proteins in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 185, 1423-31.
- MEBERG, B. M., PAULSON, A. L., PRIYADARSHINI, R. & YOUNG, K. D. 2004. Endopeptidase penicillin-binding proteins 4 and 7 play auxiliary roles in determining uniform morphology of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 186, 8326-36.
- MEDZHITOV, R. 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, 449, 819-26.
- MEESKE, A. J., SHAM, L. T., KIMSEY, H., KOO, B. M., GROSS, C. A., BERNHARDT, T. G. & RUDNER, D. Z. 2015. MurJ and a novel lipid II flippase are required for cell wall biogenesis in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, 6437-42.
- MEI, Z., WANG, F., QI, Y., ZHOU, Z., HU, Q., LI, H., WU, J. & SHI, Y. 2009. Molecular determinants of MecA as a degradation tag for the ClpCP protease. *J Biol Chem*, 284, 34366-75.
- MILOHANIC, E., JONQUIERES, R., COSSART, P., BERCHE, P. & GAILLARD, J. L. 2001. The autolysin Ami contributes to the adhesion of *Listeria monocytogenes* to eukaryotic cells via its cell wall anchor. *Mol Microbiol*, 39, 1212-24.
- MITJA, O., PIGRAU, C., RUIZ, I., VIDAL, X., ALMIRANTE, B., PLANES, A. M., MOLINA, I., RODRIGUEZ, D. & PAHISSA, A. 2009. Predictors of mortality and impact of aminoglycosides on outcome in listeriosis in a retrospective cohort study. *J Antimicrob Chemother*, 64, 416-23.
- MITSCHER, L. A. 2005. Bacterial topoisomerase inhibitors: quinolone and pyridone antibacterial agents. *Chem Rev*, 105, 559-92.
- MIZYED, S., ODDONE, A., BYCZYNSKI, B., HUGHES, D. W. & BERTI, P. J. 2005. UDP-N-acetylmuramic acid (UDP-MurNAc) is a potent inhibitor of MurA (enolpyruvyl-UDP-GlcNAc synthase). *Biochemistry*, 44, 4011-7.
- MOBLEY, H. L., KOCH, A. L., DOYLE, R. J. & STREIPS, U. N. 1984. Insertion and fate of the cell wall in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 158, 169-79.
- MOHAMMADI, T., KARCZMAREK, A., CROUVOISIER, M., BOUHSS, A., MENGIN-LECREULX, D. & DEN BLAAUWEN, T. 2007. The essential peptidoglycan glycosyltransferase MurG forms a complex with proteins involved in lateral envelope growth as well as with proteins involved in cell division in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 65, 1106-21.
- MOHAMMADI, T., VAN DAM, V., SIJBRANDI, R., VERNET, T., ZAPUN, A., BOUHSS, A., DIEPEVEEN-DE BRUIN, M., NGUYEN-DISTECHE, M., DE KRUIJFF, B. & BREUKINK, E. 2011. Identification of FtsW as a transporter of lipid-linked cell wall precursors across the membrane. *EMBO J*, 30, 1425-32.
- MONK, I. R., GAHAN, C. G. & HILL, C. 2008. Tools for functional postgenomic analysis of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol*, 74, 3921-34.
- MOOK, P., PATEL, B. & GILLESPIE, I. A. 2012. Risk factors for mortality in non-pregnancy-related listeriosis. *Epidemiol Infect*, 140, 706-15.

- MORLOT, C., BAYLE, L., JACQ, M., FLEURIE, A., TOURCIER, G., GALISSON, F., VERNET, T., GRANGEASSE, C. & DI GUILMI, A. M. 2013. Interaction of Penicillin-Binding Protein 2x and Ser/Thr protein kinase StkP, two key players in *Streptococcus pneumoniae* R6 morphogenesis. *Mol Microbiol*, 90, 88-102.
- MORLOT, C., ZAPUN, A., DIDEBERG, O. & VERNET, T. 2003. Growth and division of *Streptococcus pneumoniae*: localization of the high molecular weight penicillin-binding proteins during the cell cycle. *Mol Microbiol*, 50, 845-55.
- MOROSI, S., FRANCISCI, D. & BALDELLI, F. 2006. A case of rhombencephalitis caused by *Listeria monocytogenes* successfully treated with linezolid. *J Infect*, 52, e73-5.
- MOYED, H. S. 1964. Biochemical mechanisms of drug resistance. *Annu Rev Microbiol*, 18, 347-66.
- MSADEK, T., KUNST, F. & RAPOPORT, G. 1994. MecB of *Bacillus subtilis*, a member of the ClpC ATPase family, is a pleiotropic regulator controlling competence gene expression and growth at high temperature. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 5788-92.
- MUKHERJEE, K., ALTINCICEK, B., HAIN, T., DOMANN, E., VILCINSKAS, A. & CHAKRABORTY, T. 2010. *Galleria mellonella* as a model system for studying *Listeria* pathogenesis. *Appl Environ Microbiol*, 76, 310-7.
- MURRAY, E. G. D., WEBB, R. A. & SWANN, M. B. R. 1926. A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.). *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 29, 407-439.
- MYLONAKIS, E., PALIOU, M., HOHMANN, E. L., CALDERWOOD, S. B. & WING, E. J. 2002. Listeriosis during pregnancy: a case series and review of 222 cases. *Medicine (Baltimore)*, 81, 260-9.
- NAIR, S., FREHEL, C., NGUYEN, L., ESCUYER, V. & BERCHE, P. 1999. ClpE, a novel member of the HSP100 family, is involved in cell division and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol*, 31, 185-96.
- NAKAGAWA, J., TAMAKI, S. & MATSUHASHI, M. 1979. Purified penicillin binding proteins 1Bs from *Escherichia coli* membrane showing activities of both peptidoglycan polymerase and peptidoglycan crosslinking enzyme. *Agric. Biol. Chem.*, 43, 1379-1380.
- NAKANO, S., ZHENG, G., NAKANO, M. M. & ZUBER, P. 2002. Multiple pathways of Spx (YjbD) proteolysis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 184, 3664-70.
- NANNINGA, N. 1991. Cell division and peptidoglycan assembly in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 5, 791-5.
- NAVARRE, W. W. & SCHNEEWIND, O. 1994. Proteolytic cleavage and cell wall anchoring at the LPXTG motif of surface proteins in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol*, 14, 115-21.
- NAVARRE, W. W. & SCHNEEWIND, O. 1999. Surface proteins of Gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev*, 63, 174-229.
- NEUHAUS, F. C., HEATON, M. P., DEBABOV, D. V. & ZHANG, Q. 1996. The *dlt* operon in the biosynthesis of D-alanyl-lipoteichoic acid in *Lactobacillus casei*. *Microb Drug Resist*, 2, 77-84.
- NGUYEN, L. T., GUMBART, J. C., BEEBY, M. & JENSEN, G. J. 2015. Coarse-grained simulations of bacterial cell wall growth reveal that local coordination alone can be sufficient to maintain rod shape. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, E3689-98.
- NKUO, T. K. & EGWU, I. N. 1980. The effects of iron and temperature on the growth of *Listeria monocytogenes* in cell-free media. *Med Microbiol Immunol*, 168, 267-72.
- NOIRCLERC-SAVOYE, M., LE GOUELLEC, A., MORLOT, C., DIDEBERG, O., VERNET, T. & ZAPUN, A. 2005. *In vitro* reconstitution of a trimeric complex of DivIB, DivIC and FtsL, and their transient co-localization at the division site in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol*, 55, 413-24.
- NTAMERE, A. S., TARON, D. J. & NEUHAUS, F. C. 1987. Assembly of D-alanyl-lipoteichoic acid in *Lactobacillus casei*: mutants deficient in the D-alanyl ester content of this amphiphile. *J Bacteriol*, 169, 1702-11.
- OLIVA, M. A., HALBEDEL, S., FREUND, S. M., DUTOW, P., LEONARD, T. A., VEPRINTSEV, D. B., HAMOEN, L. W. & LOWE, J. 2010. Features critical for membrane binding revealed by DivIVA crystal structure. *EMBO J*, 29, 1988-2001.
- OSANAI, A., LI, S. J., ASANO, K., SASHINAMI, H., HU, D. L. & NAKANE, A. 2013. Fibronectin-binding protein, FbpA, is the adhesin responsible for pathogenesis of *Listeria monocytogenes* infection. *Microbiol Immunol*, 57, 253-62.
- PAIK, J., KERN, I., LURZ, R. & HAKENBECK, R. 1999. Mutational analysis of the *Streptococcus pneumoniae* bimodular class A penicillin-binding proteins. *J Bacteriol*, 181, 3852-6.
- PAN, Q., GARSIN, D. A. & LOSICK, R. 2001. Self-reinforcing activation of a cell-specific transcription factor by proteolysis of an anti-sigma factor in *B. subtilis*. *Mol Cell*, 8, 873-83.
- PARIDA, S. K., DOMANN, E., ROHDE, M., MULLER, S., DARJI, A., HAIN, T., WEHLAND, J. & CHAKRABORTY, T. 1998. Internalin B is essential for adhesion and mediates the invasion of *Listeria monocytogenes* into human endothelial cells. *Mol Microbiol*, 28, 81-93.
- PARK, W. & MATSUHASHI, M. 1984. *Staphylococcus aureus* and *Micrococcus luteus* peptidoglycan transglycosylases that are not penicillin-binding proteins. *J Bacteriol*, 157, 538-44.

- PARK, W., SETO, H., HAKENBECK, R. & MATSUHASHI, M. 1985. Major peptidoglycan transglycosylase activity in *Streptococcus pneumoniae* that is not a penicillin-binding protein. *FEMS Microbiology Letters*, 27, 45-48.
- PATRICK, J. E. & KEARNS, D. B. 2008. MinJ (YvjD) is a topological determinant of cell division in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 70, 1166-79.
- PATSKOVSKY, Y., OZYURT, S., FREEMAN, J., IIZUKA, M., MALETIC, M., SMITH, D., WASSERMAN, S., SAUDER, J. M., BURLEY, S. K. & ALMO, S. C. unpublished. Crystal structure of protein ba_1542 from *Bacillus anthracis* str. ames.
- PATTI, J. M., ALLEN, B. L., MCGAVIN, M. J. & HOOK, M. 1994. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu Rev Microbiol*, 48, 585-617.
- PEDERSEN, L. B., ANGERT, E. R. & SETLOW, P. 1999. Septal localization of penicillin-binding protein 1 in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 181, 3201-11.
- PEEL, M., DONACHIE, W. & SHAW, A. 1988. Temperature-dependent expression of flagella of *Listeria monocytogenes* studied by electron microscopy, SDS-PAGE and western blotting. *J Gen Microbiol*, 134, 2171-8.
- PENTECOST, M., OTTO, G., THERIOT, J. A. & AMIEVA, M. R. 2006. *Listeria monocytogenes* invades the epithelial junctions at sites of cell extrusion. *PLoS Pathog*, 2, e3.
- PEREGO, M., GLASER, P., MINUTELLO, A., STRAUCH, M. A., LEOPOLD, K. & FISCHER, W. 1995. Incorporation of D-alanine into lipoteichoic acid and wall teichoic acid in *Bacillus subtilis*. Identification of genes and regulation. *J Biol Chem*, 270, 15598-606.
- PEREZ-NUNEZ, D., BRIANDET, R., DAVID, B., GAUTIER, C., RENAULT, P., HALLET, B., HOLS, P., CARBALLIDO-LOPEZ, R. & GUEDON, E. 2011. A new morphogenesis pathway in bacteria: unbalanced activity of cell wall synthesis machineries leads to coccus-to-rod transition and filamentation in ovococci. *Mol Microbiol*, 79, 759-71.
- PERKINS, H. R. 1969. Specificity of combination between mucopeptide precursors and vancomycin or ristocetin. *Biochem J*, 111, 195-205.
- PERSUH, M., TURGAY, K., MANDIC-MULEC, I. & DUBNAU, D. 1999. The N- and C-terminal domains of MecA recognize different partners in the competence molecular switch. *Mol Microbiol*, 33, 886-94.
- PESCHEL, A., OTTO, M., JACK, R. W., KALBACHER, H., JUNG, G. & GOTZ, F. 1999. Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J Biol Chem*, 274, 8405-10.
- PIERRE, J., BOISIVON, A. & GUTMANN, L. 1990. Alteration of PBP 3 entails resistance to imipenem in *Listeria monocytogenes*. *Antimicrob Agents Chemother*, 34, 1695-8.
- PILGRIM, S., KOLB-MÄURER, A., GENTSCHEV, I., GOEBEL, W. & KUHN, M. 2003. Deletion of the gene encoding p60 in *Listeria monocytogenes* leads to abnormal cell division and loss of actin-based motility. *Infect Immun*, 71, 3473-84.
- PINHO, M. G. & ERRINGTON, J. 2004. A *divIVA* null mutant of *Staphylococcus aureus* undergoes normal cell division. *FEMS Microbiol Lett*, 240, 145-9.
- PINHO, M. G., KJOS, M. & VEENING, J. W. 2013. How to get (a)round: mechanisms controlling growth and division of coccoid bacteria. *Nat Rev Microbiol*, 11, 601-14.
- PIRIE, J. H. H. 1927. A new disease in veld rodents, Tiger river disease. *Publ S Afr Inst Med Res*, 3, 163-86.
- POMPEO, F., FOULQUIER, E., SERRANO, B., GRANGEASSE, C. & GALINIER, A. 2015. Phosphorylation of the cell division protein GpsB regulates PrkC kinase activity through a negative feedback loop in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*.
- POPHAM, D. L. & SETLOW, P. 1993. Cloning, nucleotide sequence, and regulation of the *Bacillus subtilis* *pbpF* gene, which codes for a putative class A high-molecular-weight penicillin-binding protein. *J Bacteriol*, 175, 4870-6.
- POPHAM, D. L. & SETLOW, P. 1994. Cloning, nucleotide sequence, mutagenesis, and mapping of the *Bacillus subtilis* *pbpD* gene, which codes for penicillin-binding protein 4. *J Bacteriol*, 176, 7197-205.
- POPHAM, D. L. & SETLOW, P. 1995. Cloning, nucleotide sequence, and mutagenesis of the *Bacillus subtilis* *ponA* operon, which codes for penicillin-binding protein (PBP) 1 and a PBP-related factor. *J Bacteriol*, 177, 326-35.
- POPHAM, D. L. & SETLOW, P. 1996. Phenotypes of *Bacillus subtilis* mutants lacking multiple class A high-molecular-weight penicillin-binding proteins. *J Bacteriol*, 178, 2079-85.
- PRELICH, G. 1999. Suppression mechanisms: themes from variations. *Trends Genet*, 15, 261-6.
- PROMADEJ, N., FIEDLER, F., COSSART, P., DRAMSI, S. & KATHARIOU, S. 1999. Cell wall teichoic acid glycosylation in *Listeria monocytogenes* serotype 4b requires *gtcA*, a novel, serogroup-specific gene. *J Bacteriol*, 181, 418-25.
- PUCCIARELLI, M. G., CALVO, E., SABET, C., BIERNE, H., COSSART, P. & GARCIA-DEL PORTILLO, F. 2005. Identification of substrates of the *Listeria monocytogenes* sortases A and B by a non-gel proteomic analysis. *Proteomics*, 5, 4808-17.

- RAFELSKI, S. M. & THERIOT, J. A. 2006. Mechanism of polarization of *Listeria monocytogenes* surface protein ActA. *Mol Microbiol*, 59, 1262-79.
- RAMAMURTHI, K. S. & LOSICK, R. 2009. Negative membrane curvature as a cue for subcellular localization of a bacterial protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 13541-5.
- RAMASWAMY, V., CRESENCE, V. M., REJITHA, J. S., LEKSHMI, M. U., DHARSANA, K. S., PRASAD, S. P. & VIJILA, H. M. 2007. *Listeria* - review of epidemiology and pathogenesis. *J Microbiol Immunol Infect*, 40, 4-13.
- RAMIREZ-ARCOS, S., LIAO, M., MARTHALER, S., RIGDEN, M. & DILLON, J. A. 2005. *Enterococcus faecalis* divIVA: an essential gene involved in cell division, cell growth and chromosome segregation. *Microbiology*, 151, 1381-93.
- RAMOS, A., HONRUBIA, M. P., VALBUENA, N., VAQUERA, J., MATEOS, L. M. & GIL, J. A. 2003. Involvement of DivIVA in the morphology of the rod-shaped actinomycete *Brevibacterium lactofermentum*. *Microbiology*, 149, 3531-42.
- RAO, C. V. S., DE WAELEHNS, E., ECONOMOU, A. & ANNE, J. 2014. Antibiotic targeting of the bacterial secretory pathway. *Biochim Biophys Acta*, 1843, 1762-83.
- RAVIKUMAR, V., SHI, L., KRUG, K., DEROUICHE, A., JERS, C., COUSIN, C., KOBIR, A., MIJAKOVIC, I. & MACEK, B. 2014. Quantitative phosphoproteome analysis of *Bacillus subtilis* reveals novel substrates of the kinase PrkC and phosphatase PrpC. *Mol Cell Proteomics*, 13, 1965-78.
- RAWLINGS, N. D. & BARRETT, A. J. 1995. Evolutionary families of metallopeptidases. *Methods Enzymol*, 248, 183-228.
- READ, T. D., PETERSON, S. N., TOURASSE, N., BAILLIE, L. W., PAULSEN, I. T., NELSON, K. E., TETTELIN, H., FOUTS, D. E., EISEN, J. A., GILL, S. R., HOLTZAPPLE, E. K., OKSTAD, O. A., HELGASON, E., RILSTONE, J., WU, M., KOLONAY, J. F., BEANAN, M. J., DODSON, R. J., BRINKAC, L. M., GWINN, M., DEBOY, R. T., MADPU, R., DAUGHERTY, S. C., DURKIN, A. S., HAFT, D. H., NELSON, W. C., PETERSON, J. D., POP, M., KHOURI, H. M., RADUNE, D., BENTON, J. L., MAHAMOUD, Y., JIANG, L., HANCE, I. R., WEIDMAN, J. F., BERRY, K. J., PLAUT, R. D., WOLF, A. M., WATKINS, K. L., NIERMAN, W. C., HAZEN, A., CLINE, R., REDMOND, C., THWAITE, J. E., WHITE, O., SALZBERG, S. L., THOMASON, B., FRIEDLANDER, A. M., KOEHLER, T. M., HANNA, P. C., KOLSTO, A. B. & FRASER, C. M. 2003. The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames and comparison to closely related bacteria. *Nature*, 423, 81-6.
- RICARD, M. & HIROTA, Y. 1973. Process of cellular division in *Escherichia coli*: physiological study on thermosensitive mutants defective in cell division. *J Bacteriol*, 116, 314-22.
- RISMONDO, J., CLEVERLEY, R. M., LANE, H. V., GROSSHENNIG, S., STEGLICH, A., MOLLER, L., MANNALA, G. K., HAIN, T., LEWIS, R. J. & HALBEDEL, S. 2015a. Structure of the bacterial cell division determinant GpsB and its interaction with penicillin binding proteins. *Mol Microbiol*.
- RISMONDO, J., MOLLER, L., ALDRIDGE, C., GRAY, J., VOLLMER, W. & HALBEDEL, S. 2015b. Discrete and overlapping functions of peptidoglycan synthases in growth, cell division and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol*, 95, 332-51.
- ROBERT-KOCH-INSTITUT 2015. Listeriose. *RKI-Ratgeber für Ärzte*.
- ROCOURT, J., BOERLIN, P., GRIMONT, F., JACQUET, C. & PIFFARETTI, J. C. 1992. Assignment of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a single species, *Listeria grayi*, with a revised description of *Listeria grayi*. *Int J Syst Bacteriol*, 42, 171-4.
- ROCOURT, J. & GRIMONT, P. A. 1983. *Listeria welshimeri* sp. nov. and *Listeria seeligeri* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 33, 866-869.
- ROGERS, H. J., PERKINS, H. R. & WARD, J. B. 1980. Microbial Cell Walls and Membranes. *Chapman and Hall New York, N.Y.*, 10, 33-33.
- RUOSLAHTI, E., VAHERI, A., KUUSELA, P. & LINDER, E. 1973. Fibroblast surface antigen: a new serum protein. *Biochim Biophys Acta*, 322, 352-8.
- SABET, C., LECUIT, M., CABANES, D., COSSART, P. & BIERNE, H. 2005. LPXTG protein InlJ, a newly identified internalin involved in *Listeria monocytogenes* virulence. *Infect Immun*, 73, 6912-22.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SAMLAND, A. K., AMRHEIN, N. & MACHEROUX, P. 1999. Lysine 22 in UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase from *Enterobacter cloacae* is crucial for enzymatic activity and the formation of covalent adducts with the substrate phosphoenolpyruvate and the antibiotic fosfomycin. *Biochemistry*, 38, 13162-9.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 5463-7.
- SAUVAGE, E., KERFF, F., TERRAK, M., AYALA, J. A. & CHARLIER, P. 2008. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev*, 32, 234-58.

- SCHEFFERS, D. J. & ERRINGTON, J. 2004. PBP1 is a component of the *Bacillus subtilis* cell division machinery. *J Bacteriol*, 186, 5153-6.
- SCHEFFERS, D. J., JONES, L. J. & ERRINGTON, J. 2004. Several distinct localization patterns for penicillin-binding proteins in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 51, 749-64.
- SCHEFFERS, D. J. & PINHO, M. G. 2005. Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. *Microbiol Mol Biol Rev*, 69, 585-607.
- SCHIRMER, E. C., GLOVER, J. R., SINGER, M. A. & LINDQUIST, S. 1996. HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends Biochem Sci*, 21, 289-96.
- SCHLECH, W. F., 3RD, LAVIGNE, P. M., BORTOLUSSI, R. A., ALLEN, A. C., HALDANE, E. V., WORT, A. J., HIGHTOWER, A. W., JOHNSON, S. E., KING, S. H., NICHOLLS, E. S. & BROOME, C. V. 1983. Epidemic listeriosis--evidence for transmission by food. *N Engl J Med*, 308, 203-6.
- SCHLOTHAUER, T., MOGK, A., DOUGAN, D. A., BUKAU, B. & TURGAY, K. 2003. MecA, an adaptor protein necessary for ClpC chaperone activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 2306-11.
- SCHMIDT, R. L., FILAK, H. C., LEMON, J. D., POTTER, T. A. & LENZ, L. L. 2011. A LysM and SH3-domain containing region of the *Listeria monocytogenes* p60 protein stimulates accessory cells to promote activation of host NK cells. *PLoS Pathog*, 7, e1002368.
- SCHONBRUNN, E., ESCHENBURG, S., SHUTTLEWORTH, W. A., SCHLOSS, J. V., AMRHEIN, N., EVANS, J. N. & KABSCH, W. 2001. Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 1376-80.
- SCHWARZ, U., ASMUS, A. & FRANK, H. 1969. Autolytic enzymes and cell division of *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, 41, 419-29.
- SCHWECHHEIMER, C., SERINO, G., CALLIS, J., CROSBY, W. L., LYAPINA, S., DESHAIES, R. J., GRAY, W. M., ESTELLE, M. & DENG, X. W. 2001. Interactions of the COP9 signalosome with the E3 ubiquitin ligase SCFTIR1 in mediating auxin response. *Science*, 292, 1379-82.
- SEELIGER, H. P. 1958. Listeriose. 2nd ed. *Johann Ambrosius Barth Verlag, Leipzig (1961, Listeriosis. 2nd ed. Hafner Publishing Co., Inc., New York.)*.
- SEELIGER, H. P. 1981. [Nonpathogenic listeriae: *L. innocua* sp. n. (Seeliger et Schoofs, 1977) (author's transl)]. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A*, 249, 487-93.
- SEELIGER, H. P. R., ROCOURT, J., SCHRETTENBRUNNER, A., GRIMONT, P. A. D. & JONES, D. 1984. *Listeria ivanovii* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 34, 336-337.
- SHAM, L. T., BUTLER, E. K., LEBAR, M. D., KAHNE, D., BERNHARDT, T. G. & RUIZ, N. 2014. Bacterial cell wall. MurJ is the flippase of lipid-linked precursors for peptidoglycan biogenesis. *Science*, 345, 220-2.
- SIEGER, B. & BRAMKAMP, M. 2014. Interaction sites of DivIVA and RodA from *Corynebacterium glutamicum*. *Front Microbiol*, 5, 738.
- SIEGER, B., SCHUBERT, K., DONOVAN, C. & BRAMKAMP, M. 2013. The lipid II flippase RodA determines morphology and growth in *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Microbiol*, 90, 966-82.
- SIEVERS, F., WILM, A., DINEEN, D., GIBSON, T. J., KARPLUS, K., LI, W., LOPEZ, R., MCWILLIAM, H., REMMERT, M., SODING, J., THOMPSON, J. D. & HIGGINS, D. G. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol*, 7, 539.
- SKARZYNSKI, T., MISTRY, A., WONACOTT, A., HUTCHINSON, S. E., KELLY, V. A. & DUNCAN, K. 1996. Structure of UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase, an enzyme essential for the synthesis of bacterial peptidoglycan, complexed with substrate UDP-N-acetylglucosamine and the drug fosfomycin. *Structure*, 4, 1465-74.
- SOUFO, H. J. & GRAUMANN, P. L. 2003. Actin-like proteins MreB and Mbl from *Bacillus subtilis* are required for bipolar positioning of replication origins. *Curr Biol*, 13, 1916-20.
- SPRATT, B. G. 1975. Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K12. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72, 2999-3003.
- SPRATT, B. G. & JOBANPUTRA, V. 1977. Mutants of *Escherichia coli* which lack a component of penicillin-binding protein 1 are viable. *FEBS Lett*, 79, 374-8.
- SQUIRES, C. & SQUIRES, C. L. 1992. The Clp proteins: proteolysis regulators or molecular chaperones? *J Bacteriol*, 174, 1081-5.
- SRINIVASAN, V., NAM, H. M., NGUYEN, L. T., TAMILSELVAM, B., MURINDA, S. E. & OLIVER, S. P. 2005. Prevalence of antimicrobial resistance genes in *Listeria monocytogenes* isolated from dairy farms. *Foodborne Pathog Dis*, 2, 201-11.
- STEIL, L., HOFFMANN, T., BUDDE, I., VOLKER, U. & BREMER, E. 2003. Genome-wide transcriptional profiling analysis of adaptation of *Bacillus subtilis* to high salinity. *J Bacteriol*, 185, 6358-70.
- STRAUSS, M. P., LIEW, A. T., TURNBULL, L., WHITCHURCH, C. B., MONAHAN, L. G. & HARRY, E. J. 2012. 3D-SIM super resolution microscopy reveals a bead-like arrangement for FtsZ and the division machinery: implications for triggering cytokinesis. *PLoS Biol*, 10, e1001389.

- SUNG, M. T., LAI, Y. T., HUANG, C. Y., CHOU, L. Y., SHIH, H. W., CHENG, W. C., WONG, C. H. & MA, C. 2009. Crystal structure of the membrane-bound bifunctional transglycosylase PBP1b from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 8824-9.
- SUZUKI, H., NISHIMURA, Y. & HIROTA, Y. 1978. On the process of cellular division in *Escherichia coli*: a series of mutants of *E. coli* altered in the penicillin-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75, 664-8.
- SWAMINATHAN, B. & GERNER-SMIDT, P. 2007. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes Infect*, 9, 1236-43.
- TAVARES, J. R., DE SOUZA, R. F., MEIRA, G. L. & GUEIROS-FILHO, F. J. 2008. Cytological characterization of YpsB, a novel component of the *Bacillus subtilis* divisome. *J Bacteriol*, 190, 7096-107.
- TERRAK, M., GHOSH, T. K., VAN HEIJENOORT, J., VAN BEEUMEN, J., LAMPILAS, M., ASZODI, J., AYALA, J. A., GHUYSEN, J. M. & NGUYEN-DISTECHE, M. 1999. The catalytic, glycosyl transferase and acyl transferase modules of the cell wall peptidoglycan-polymerizing penicillin-binding protein 1b of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 34, 350-64.
- THOMAIDES, H. B., FREEMAN, M., EL KAROUI, M. & ERRINGTON, J. 2001. Division site selection protein DivIVA of *Bacillus subtilis* has a second distinct function in chromosome segregation during sporulation. *Genes Dev*, 15, 1662-73.
- THOMAS, A. M., GINJ, C., JELESAROV, I., AMRHEIN, N. & MACHEROUX, P. 2004. Role of K22 and R120 in the covalent binding of the antibiotic fosfomycin and the substrate-induced conformational change in UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase. *Eur J Biochem*, 271, 2682-90.
- TILNEY, L. G. & PORTNOY, D. A. 1989. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol*, 109, 1597-608.
- TIPPER, D. J. & STROMINGER, J. L. 1965. Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 54, 1133-41.
- TRAVIER, L. & LECUIT, M. 2014. *Listeria monocytogenes* ActA: a new function for a 'classic' virulence factor. *Curr Opin Microbiol*, 17, 53-60.
- TROXLER, R., VON GRAEVENITZ, A., FUNKE, G., WIEDEMANN, B. & STOCK, I. 2000. Natural antibiotic susceptibility of *Listeria* species: *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* and *L. welshimeri* strains. *Clin Microbiol Infect*, 6, 525-35.
- TURGAY, K., HAHN, J., BURGHOOORN, J. & DUBNAU, D. 1998. Competence in *Bacillus subtilis* is controlled by regulated proteolysis of a transcription factor. *EMBO J*, 17, 6730-8.
- TURGAY, K., HAMOEN, L. W., VENEMA, G. & DUBNAU, D. 1997. Biochemical characterization of a molecular switch involving the heat shock protein ClpC, which controls the activity of ComK, the competence transcription factor of *Bacillus subtilis*. *Genes Dev*, 11, 119-28.
- TURINI, P., KUROOKA, S., STEER, M., CORBASCIO, A. N. & SINGER, T. P. 1969. The action of phenylmethylsulfonyl fluoride on human acetylcholinesterase, chymotrypsin and trypsin. *J Pharmacol Exp Ther*, 167, 98-104.
- TURNER, R. D., VOLLMER, W. & FOSTER, S. J. 2014. Different walls for rods and balls: the diversity of peptidoglycan. *Mol Microbiol*, 91, 862-74.
- TYPAS, A., BANZHAF, M., GROSS, C. A. & VOLLMER, W. 2012. From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nat Rev Microbiol*, 10, 123-36.
- VAHERI, A., RUOSLAHTI, E., LINDER, E., WARTIOVAARA, J., KESKI-OJA, J., KUUSELA, P. & SAKSELA, O. 1976. Fibroblast surface antigen (SF): molecular properties, distribution *in vitro* and *in vivo*, and altered expression in transformed cells. *J Supramol Struct*, 4, 63-70.
- VAN BAARLE, S., CELIK, I. N., KAVAL, K. G., BRAMKAMP, M., HAMOEN, L. W. & HALBEDEL, S. 2013. Protein-protein interaction domains of *Bacillus subtilis* DivIVA. *J Bacteriol*, 195, 1012-21.
- VAN DE VELDE, S., CARRY, S., VAN BAMBEKE, F., HILL, C., TULKENS, P. M. & SLEATOR, R. D. 2009. Penicillin-binding proteins (PBP) and Lmo0441 (a PBP-like protein) play a role in Beta-lactam sensitivity of *Listeria monocytogenes*. *Gut Pathog*, 1, 23.
- VAN DEN ENT, F., AMOS, L. A. & LOWE, J. 2001. Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. *Nature*, 413, 39-44.
- VAN DEN ENT, F., LEAVER, M., BENDEZU, F., ERRINGTON, J., DE BOER, P. & LOWE, J. 2006. Dimeric structure of the cell shape protein MreC and its functional implications. *Mol Microbiol*, 62, 1631-42.
- VAN DER PLOEG, R., VERHEUL, J., VISCHER, N. O., ALEXEEVA, S., HOOGENDOORN, E., POSTMA, M., BANZHAF, M., VOLLMER, W. & DEN BLAAUWEN, T. 2013. Colocalization and interaction between elongasome and divisome during a preparative cell division phase in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 87, 1074-87.
- VAN HEIJENOORT, J. 2001. Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. *Glycobiology*, 11, 25R-36R.

- VAN HEIJENOORT, Y., DERRIEN, M. & VAN HEIJENOORT, J. 1978. Polymerization by transglycosylation in the biosynthesis of the peptidoglycan of *Escherichia coli* K 12 and its inhibition by antibiotics. *FEBS Lett*, 89, 141-4.
- VAN HEIJENOORT, Y. & VAN HEIJENOORT, J. 1980. Biosynthesis of the peptidoglycan of *Escherichia coli* K-12: properties of the *in vitro* polymerization by transglycosylation. *FEBS Lett*, 110, 241-4.
- VAN OPIJNEN, T., BODI, K. L. & CAMILLI, A. 2009. Tn-seq: high-throughput parallel sequencing for fitness and genetic interaction studies in microorganisms. *Nat Methods*, 6, 767-72.
- VAN TEEFFELN, S., WANG, S., FURCHTGOTT, L., HUANG, K. C., WINGREEN, N. S., SHAEVITZ, J. W. & GITAI, Z. 2011. The bacterial actin MreB rotates, and rotation depends on cell-wall assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 15822-7.
- VARLEY, A. W. & STEWART, G. C. 1992. The *divIVB* region of the *Bacillus subtilis* chromosome encodes homologs of *Escherichia coli* septum placement (*minCD*) and cell shape (*mreBCD*) determinants. *J Bacteriol*, 174, 6729-42.
- VAZQUEZ-BOLAND, J. A., DOMINGUEZ-BERNAL, G., GONZALEZ-ZORN, B., KREFT, J. & GOEBEL, W. 2001. Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*. *Microbes Infect*, 3, 571-84.
- VERMA, R., ARAVIND, L., OANIA, R., MCDONALD, W. H., YATES, J. R., 3RD, KOONIN, E. V. & DESHAIES, R. J. 2002. Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science*, 298, 611-5.
- VESIĆ, D. & KRISTICH, C. J. 2012. MurAA is required for intrinsic cephalosporin resistance of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 56, 2443-51.
- VICENTE, M. & GARCIA-OVALLE, M. 2007. Making a point: the role of DivIVA in streptococcal polar anatomy. *J Bacteriol*, 189, 1185-8.
- VICENTE, M. F., PEREZ-DAZ, J. C., BAQUERO, F., ANGEL DE PEDRO, M. & BERENGUER, J. 1990. Penicillin-binding protein 3 of *Listeria monocytogenes* as the primary lethal target for beta-lactams. *Antimicrob Agents Chemother*, 34, 539-42.
- VOLLMER, W. 2008. Structural variation in the glycan strands of bacterial peptidoglycan. *FEMS Microbiol Rev*, 32, 287-306.
- VOLLMER, W. & BERTSCHE, U. 2008. Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*, 1778, 1714-34.
- VOLLMER, W. & HÖLTJE, J. V. 2004. The architecture of the murein (peptidoglycan) in Gram-negative bacteria: vertical scaffold or horizontal layer(s)? *J Bacteriol*, 186, 5978-87.
- VOLLMER, W., JORIS, B., CHARLIER, P. & FOSTER, S. 2008. Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol Rev*, 32, 259-86.
- VOLLMER, W. & TOMASZ, A. 2000. The *pgdA* gene encodes for a peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylase in *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem*, 275, 20496-501.
- WACHI, M., DOI, M., OKADA, Y. & MATSUHASHI, M. 1989. New *mre* genes *mreC* and *mreD*, responsible for formation of the rod shape of *Escherichia coli* cells. *J Bacteriol*, 171, 6511-6.
- WACHI, M., DOI, M., TAMAKI, S., PARK, W., NAKAJIMA-IIJIMA, S. & MATSUHASHI, M. 1987. Mutant isolation and molecular cloning of *mre* genes, which determine cell shape, sensitivity to mecillinam, and amount of penicillin-binding proteins in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 169, 4935-40.
- WACHI, M. & MATSUHASHI, M. 1989. Negative control of cell division by *mreB*, a gene that functions in determining the rod shape of *Escherichia coli* cells. *J Bacteriol*, 171, 3123-7.
- WANG, F., MEI, Z., QI, Y., YAN, C., HU, Q., WANG, J. & SHI, Y. 2011. Structure and mechanism of the hexameric MecA-ClpC molecular machine. *Nature*, 471, 331-5.
- WANKE, C. & AMRHEIN, N. 1993. Evidence that the reaction of the UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase proceeds through the O-phosphothioketal of pyruvic acid bound to Cys115 of the enzyme. *Eur J Biochem*, 218, 861-70.
- WARD, J. B. 1984. Biosynthesis of peptidoglycan: points of attack by wall inhibitors. *Pharmacol Ther*, 25, 327-69.
- WAY, S. S., THOMPSON, L. J., LOPES, J. E., HAJJAR, A. M., KOLLMANN, T. R., FREITAG, N. E. & WILSON, C. B. 2004. Characterization of flagellin expression and its role in *Listeria monocytogenes* infection and immunity. *Cell Microbiol*, 6, 235-42.
- WECKE, J., MADELA, K. & FISCHER, W. 1997. The absence of D-alanine from lipoteichoic acid and wall teichoic acid alters surface charge, enhances autolysis and increases susceptibility to methicillin in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, 143, 2953-2960.
- WEI, Y., HAVASY, T., MCPHERSON, D. C. & POPHAM, D. L. 2003. Rod shape determination by the *Bacillus subtilis* class B penicillin-binding proteins encoded by *pbpA* and *pbpH*. *J Bacteriol*, 185, 4717-26.
- WEIDEL, W. & PELZER, H. 1964. Bagshaped Macromolecules--a New Outlook on Bacterial Cell Walls. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 26, 193-232.
- WEIDENMAIER, C., KOKAI-KUN, J. F., KRISTIAN, S. A., CHANTURIYA, T., KALBACHER, H., GROSS, M., NICHOLSON, G., NEUMEISTER, B., MOND, J. J. & PESCHEL, A. 2004. Role of teichoic acids

- in *Staphylococcus aureus* nasal colonization, a major risk factor in nosocomial infections. *Nat Med*, 10, 243-5.
- WEIDENMAIER, C., PESCHEL, A., XIONG, Y. Q., KRISTIAN, S. A., DIETZ, K., YEAMAN, M. R. & BAYER, A. S. 2005. Lack of wall teichoic acids in *Staphylococcus aureus* leads to reduced interactions with endothelial cells and to attenuated virulence in a rabbit model of endocarditis. *J Infect Dis*, 191, 1771-7.
- WELLER, D., ANDRUS, A., WIEDMANN, M. & DEN BAKKER, H. C. 2015. *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. *Int J Syst Evol Microbiol*, 65, 286-92.
- WELSHIMER, H. J. 1960. Survival of *Listeria monocytogenes* in soil. *J Bacteriol*, 80, 316-20.
- WELSHIMER, H. J. & DONKER-VOET, J. 1971. *Listeria monocytogenes* in nature. *Appl Microbiol*, 21, 516-9.
- WERBER, D., HILLE, K., FRANK, C., DEHNERT, M., ALTMANN, D., MÜLLER-NORDHORN, J., KOCH, J. & STARK, K. 2013. Years of potential life lost for six major enteric pathogens, Germany, 2004-2008. *Epidemiol Infect*, 141, 961-8.
- WERBROUCK, H., GRIJSPEERDT, K., BOTTELDOORN, N., VAN PAMEL, E., RIJSENS, N., VAN DAMME, J., UYTENDAELE, M., HERMAN, L. & VAN COILLIE, E. 2006. Differential *inlA* and *inlB* expression and interaction with human intestinal and liver cells by *Listeria monocytogenes* strains of different origins. *Appl Environ Microbiol*, 72, 3862-71.
- WHITE, C. L., KITICH, A. & GOBER, J. W. 2010. Positioning cell wall synthetic complexes by the bacterial morphogenetic proteins MreB and MreD. *Mol Microbiol*, 76, 616-33.
- WICKNER, S., MAURIZI, M. R. & GOTTESMAN, S. 1999. Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science*, 286, 1888-93.
- WIENTJES, F. B. & NANNINGA, N. 1991. On the role of the high molecular weight penicillin-binding proteins in the cell cycle of *Escherichia coli*. *Res Microbiol*, 142, 333-44.
- WILKINSON, B. J. & JONES, D. 1977. A numerical taxonomic survey of *Listeria* and related bacteria. *J Gen Microbiol*, 98, 399-421.
- WITTE, W. 1998. Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science*, 279, 996-7.
- WOLDRINGH, C. L., HULS, P., PAS, E., BRAKENHOFF, G. J. & NANNINGA, N. 1987. Topography of peptidoglycan synthesis during elongation and polar cap formation in a cell division mutant of *Escherichia coli* MC4100. *Microbiology*, 133, 575-586.
- WU, L. J. & ERRINGTON, J. 2003. RacA and the Soj-Spo0J system combine to effect polar chromosome segregation in sporulating *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 49, 1463-75.
- YANOURI, A., DANIEL, R. A., ERRINGTON, J. & BUCHANAN, C. E. 1993. Cloning and sequencing of the cell division gene *pbpB*, which encodes penicillin-binding protein 2B in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 175, 7604-16.
- YOUSIF, S. Y., BROOME-SMITH, J. K. & SPRATT, B. G. 1985. Lysis of *Escherichia coli* by beta-lactam antibiotics: deletion analysis of the role of penicillin-binding proteins 1A and 1B. *J Gen Microbiol*, 131, 2839-45.
- ZAPUN, A., CONTRERAS-MARTEL, C. & VERNET, T. 2008a. Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance. *FEMS Microbiol Rev*, 32, 361-85.
- ZAPUN, A., VERNET, T. & PINHO, M. G. 2008b. The different shapes of cocci. *FEMS Microbiol Rev*, 32, 345-60.
- ZAWADZKA-SKOMIAL, J., MARKIEWICZ, Z., NGUYEN-DISTECHE, M., DEVREESE, B., FRERE, J. M. & TERRAK, M. 2006. Characterization of the bifunctional glycosyltransferase/acyltransferase penicillin-binding protein 4 of *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol*, 188, 1875-81.
- ZHANG, R., DUGGAN, E., CLANCY, S. & JOACHIMIAK, A. unpublished. The crystal structure of DNA repair protein RadC from *Chlorobium tepidum* TLS. *To be published*.
- ZHAO, G., MEIER, T. I., KAHL, S. D., GEE, K. R. & BLASZCZAK, L. C. 1999. BOCILLIN FL, a sensitive and commercially available reagent for detection of penicillin-binding proteins. *Antimicrob Agents Chemother*, 43, 1124-8.
- ZHU, J. Y., YANG, Y., HAN, H., BETZI, S., OLESEN, S. H., MARSILIO, F. & SCHONBRUNN, E. 2012. Functional consequence of covalent reaction of phosphoenolpyruvate with UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase (MurA). *J Biol Chem*, 287, 12657-67.
- ZIJDERVELD, C. A., AARSMAN, M. E., DEN BLAAUWEN, T. & NANNINGA, N. 1991. Penicillin-binding protein 1B of *Escherichia coli* exists in dimeric forms. *J Bacteriol*, 173, 5740-6.

6. Anhang

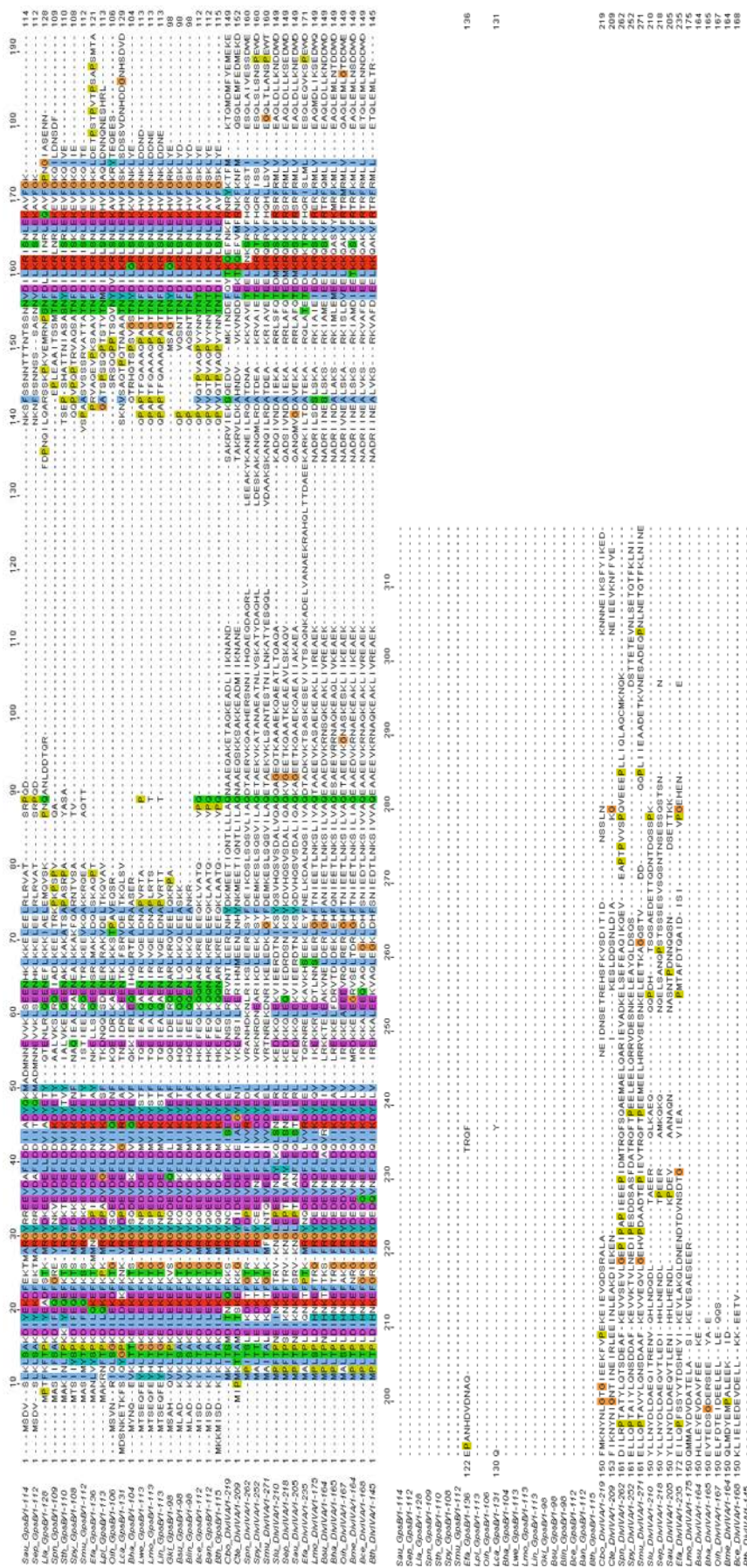


Abb. A1: Sequenzalignement von GpsB- und DivIVA-Proteinen aus *L. monocytogenes* und weiteren Firmicutes

Sequenzübereinstimmungen und Sequenzähnlichkeiten sind durch farbige Boxen visualisiert. Das Sequenzalignment wurde mit dem Programm Clustal Omega erstellt (Sievers *et al.*, 2011). Abkürzungen: *Sau* – *Staphylococcus aureus*, *Sep* – *Staphylococcus epidermidis*, *Lla* – *Lactococcus Lactis*, *Spn* – *Streptococcus pneumoniae*, *Sth* – *Streptococcus thermophilus*, *Spy* – *Streptococcus pyogenes*, *Smu* – *Streptococcus mutans*, *Efa* – *Enterococcus faecalis*, *Lpl* – *Lactobacillus plantarum*, *Oih* – *Oceanobacillus ihymensis*, *Lca* – *Lactobacillus casei*, *Bha* – *Bacillus halodurans*, *Lwe* – *Listeria welshimeri*, *Lmo* – *Listeria monocytogenes*, *Lin* – *Lactobacillus*.

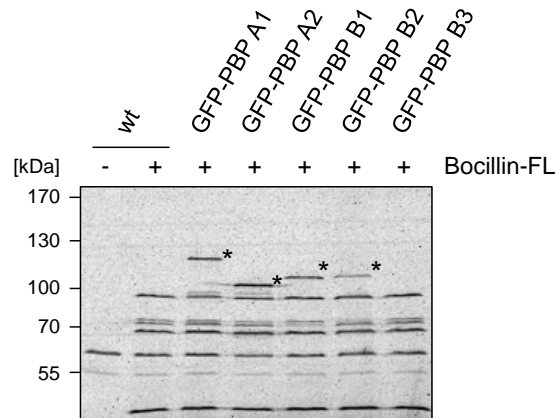


Abb. A2: Detektion der GFP-PBPs im Fluoreszenzgel

Zur Detektion der GFP-PBP-Fusionen wurden Membranfraktionen der Stämme EGD-e (wt), LMS38 (*gfp-pbpA2*), LMS44 (*gfp-pbpA1*), LMS45 (*gfp-pbpB2*), LMS46 (*gfp-pbpB1*) und LMS47 (*gfp-pbpB3*) isoliert und mit Hilfe von Bocillin-FL markiert. Die Detektion der fluoreszierenden Banden erfolgte am Fujifilm FLA 2000 Fluoreszenz-Scanner. Die detektierten GFP-PBP-Proteine wurden mit * markiert.

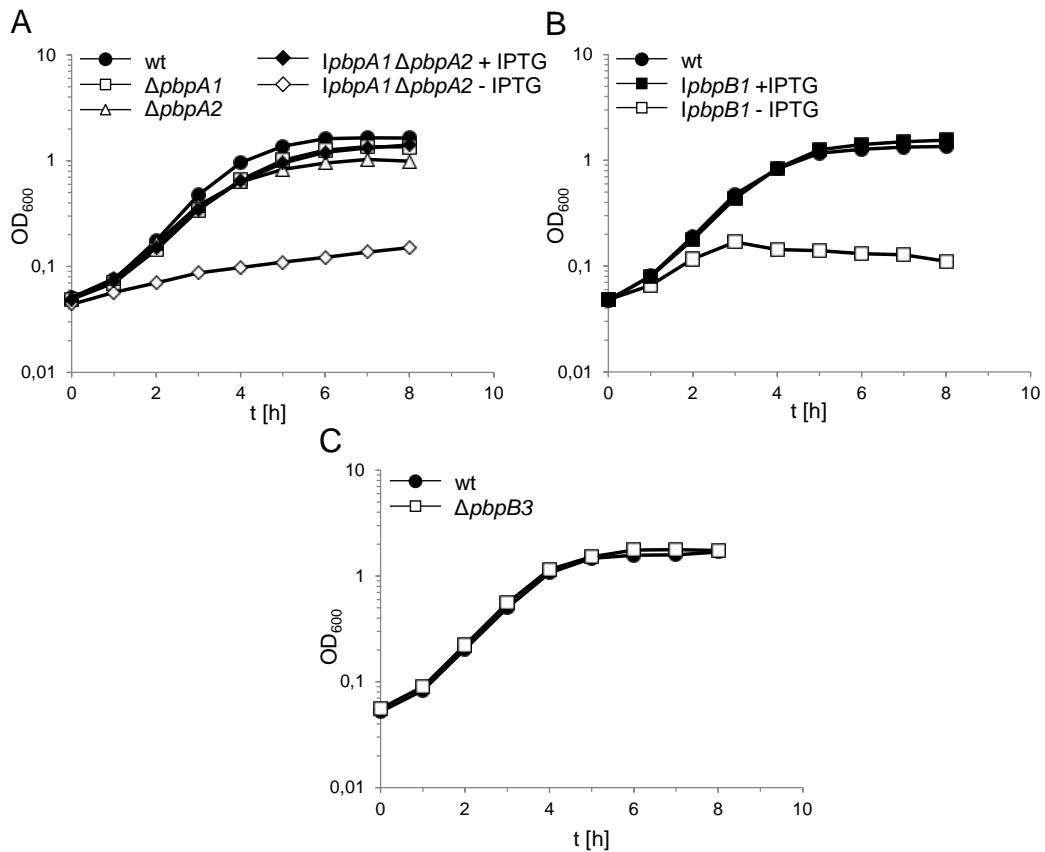


Abb. A3: Wachstum der *pbp*-Mutanten bei 42°C

(A-C) Die Stämme EGD-e, LMS57 (*ΔpbpA1*), LMS64 (*ΔpbpA2*), LMJR27 (*lpbpB1*), LMJR30 (*lpbpA1 ΔpbpA2*) und LMJR41 (*ΔpbpB3*) wurden in BHI-Medium ± 1mM IPTG angezogen und die optische Dichte ($\lambda=600$ nm) stündlich gemessen. Zur Depletion von PBP B1 und PBP A1 in LMJR27 bzw. LMJR30 wurde die Vorkultur, die in Anwesenheit von IPTG kultiviert wurde, mit BHI-Medium gewaschen und anschließend zum Animpfen verwendet. Es ist jeweils eine repräsentative Wachstumskurve dargestellt.

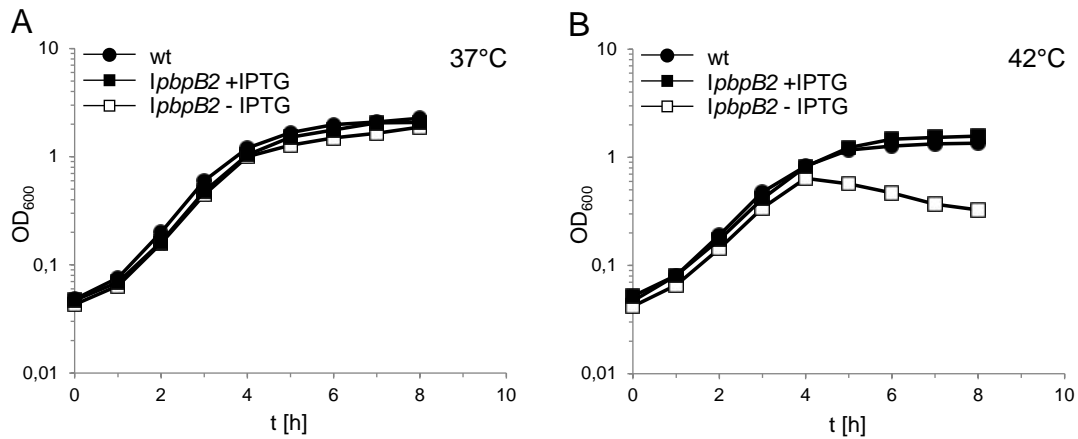


Abb. A4: Einfluss der Depletion von PBP B2 auf das Wachstum

(A-B) Wachstum der Stämme EGD-e (wt) und LMJR18 (*lppB2*) in BHI-Medium bei 37°C (A) und 42°C (B). Dafür wurde eine Vorkultur von LMJR18 in Anwesenheit von 1 mM IPTG angezogen, mit frischem BHI-Medium gewaschen und anschließend mit und ohne IPTG kultiviert. Es ist jeweils eine repräsentative Wachstumskurve dargestellt.

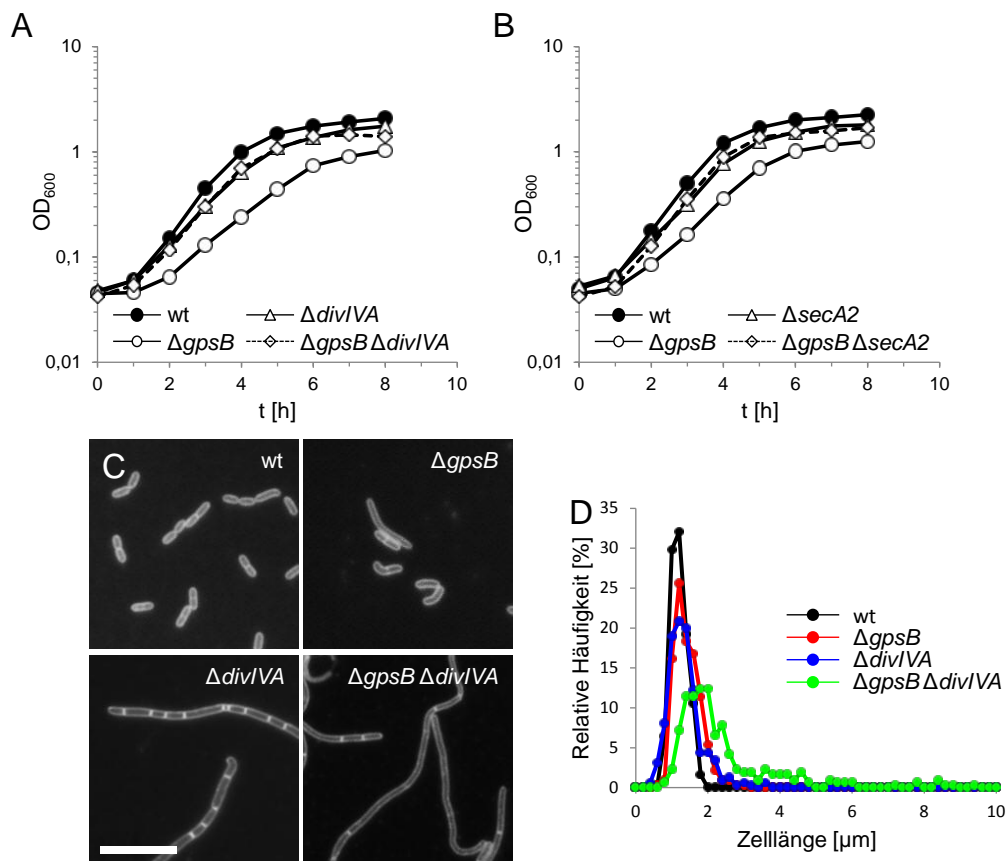


Abb. A5: Suppression des Wachstumsdefektes der *L. monocytogenes* Δ *gpsB*-Mutante durch Deletion von *divIVA* und *secA2*

(A) Wachstum der Stämme EGD-e (wt), LMJR19 (Δ *gpsB*), LMS2 (Δ *divIVA*) und LMJR28 (Δ *gpsB* Δ *divIVA*) in BHI-Medium bei 37°C. (B) Einfluss der Deletion von *secA2* auf das Wachstum der Δ *gpsB*-Mutante. Die Stämme EGD-e (wt), LMJR19 (Δ *gpsB*), LMS81 (Δ *secA2*) und LMJR37 (Δ *gpsB* Δ *secA2*) wurden bei 37°C in BHI-Medium kultiviert und die optische Dichte ($\lambda=600$ nm) stündlich bestimmt. (C) Fluoreszenz-Aufnahmen von *L. monocytogenes*-Stämmen EGD-e (wt), LMJR19 (Δ *gpsB*), LMS2 (Δ *divIVA*), und LMJR28 (Δ *gpsB* Δ *divIVA*). Die Zellen wurden bis zur mittleren logarithmischen Wachstumsphase in BHI bei 37°C kultiviert und die Membran anschließend unter Verwendung von Nilrot gefärbt. Der Maßstabsbalken entspricht 5 μ m. (D) Zelllängenverteilung der unter (C) beschriebenen Stämme. Dafür wurde die Zelllänge von durchschnittlich 300 Zellen pro Stamm gemessen.

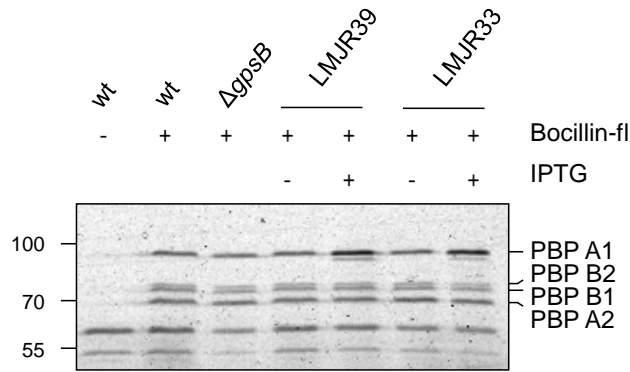


Abb. A6: Überexpression von *pbpA1*

Die *L. monocytogenes* Stämme EGD-e (wt), LMJR19 ($\Delta gpsB$), LMJR33 ($\Delta gpsB+pbpA1$) und LMJR39 (wt+*pbpA1*) wurden in BHI-Medium \pm 1 mM IPTG bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von 1 angezogen. Anschließend wurden Membranfraktionen isoliert. Nach einer Inkubation mit 3 μ M Bocillin-FL wurden die Proteine in einem 8 %-igen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Die Detektion der Fluoreszenzsignale erfolgte am Fujifilm FLA 2000 Fluoreszenz-Scanner.

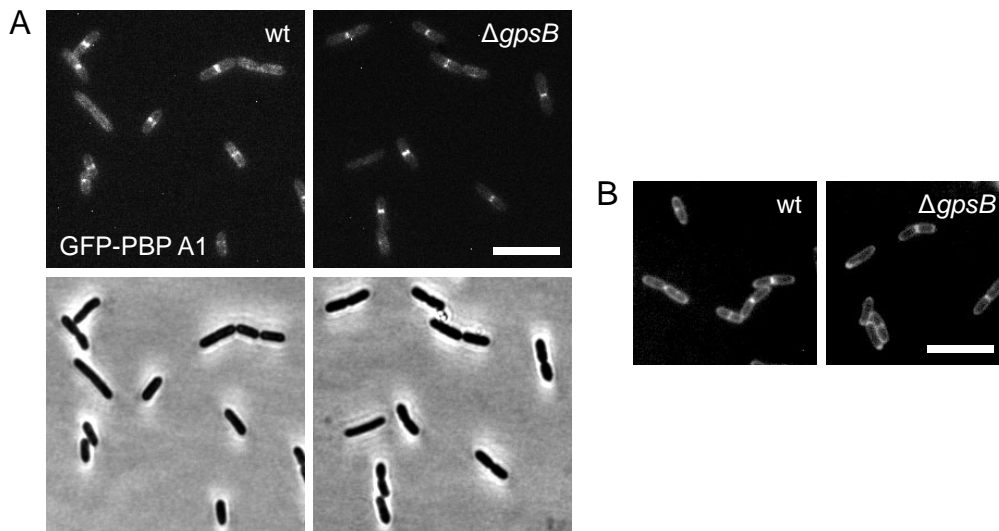


Abb. A7: Einfluss der Deletion von *gpsB* auf die Lokalisation von GFP-PBP A1 und die naszierende Zellwandsynthese

(A) Lokalisation von GFP-PBP A1 im Wildtypstamm (LMS44) und der $\Delta gpsB$ -Mutante (LMJR29). Die *L. monocytogenes*-Stämme wurden in BHI-Medium bei 30°C bis zur mittleren logarithmischen Wachstumsphase kultiviert und anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. (B) Mikroskopische Aufnahmen zur Darstellung der naszierenden Zellwandsynthese in EGD-e (wt) und LMJR19 ($\Delta gpsB$). Die Stämme wurden im BHI-Medium bei 37°C angezogen, bis sie die mittlere logarithmische Wachstumsphase erreicht haben. Nach Färbung mit Van-FL wurden Fluoreszenzaufnahmen erstellt. Die Maßstabsbalken entsprechen 5 μ m.

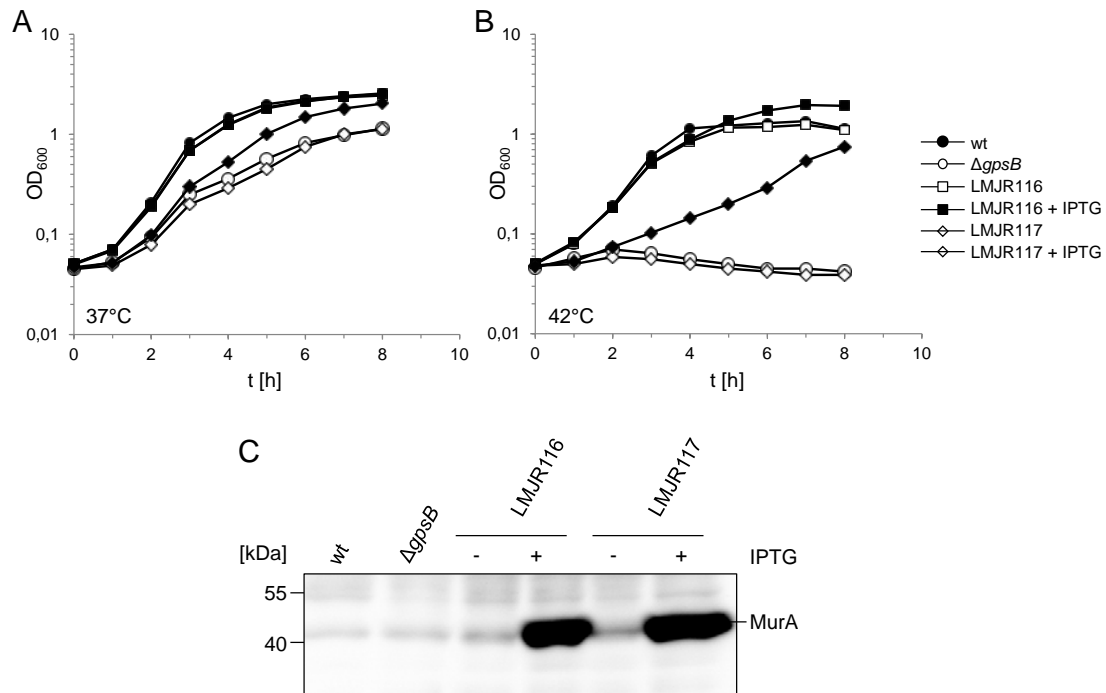


Abb. A8: Suppression des Wachstumsdefektes der $\Delta gpsB$ -Mutante durch Überexpression von *murA*

(A-B) Die Stämme EGD-e (wt), LMJR19 ($\Delta gpsB$), LMJR116 (wt+*murA*) und LMJR117 ($\Delta gpsB$ +*murA*) wurden in BHI-Medium \pm 1 mM IPTG bei 37°C (A) oder 42°C (B) angezogen und die optische Dichte ($\lambda=600$ nm) stündlich bestimmt. (C) Western-Blot zum Nachweis der IPTG-abhängigen Expression von *murA*. Die Stämme aus (A) wurden in BHI-Medium \pm 1 mM IPTG bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀=1 kultiviert, zelluläre Proteinextrakte isoliert und im Western-Blot unter Verwendung eines MurAA-spezifischen polyklonalen Antikörpers (MurAA aus *Bacillus subtilis*) analysiert.

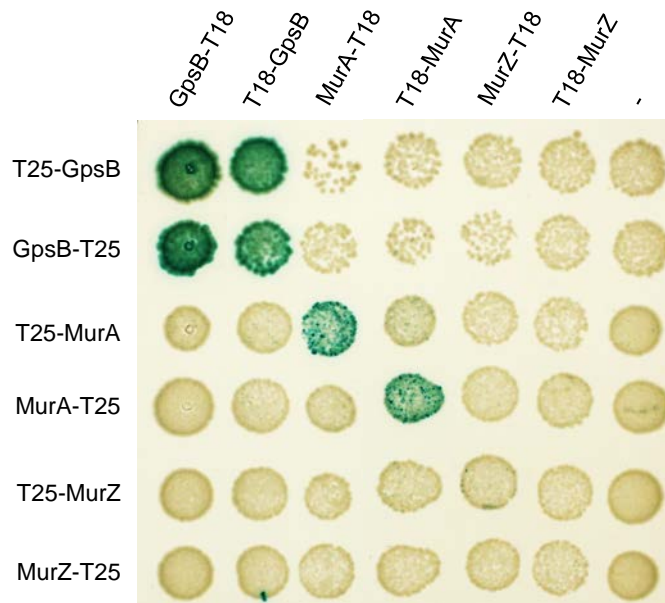


Abb. A9: Interaktion von GpsB mit MurA und MurZ

Bacterial Two-Hybrid-Assay zur Analyse der Interaktion von GpsB mit MurA und MurZ. Die Gene *gpsB*, *murA* und *murZ* wurden mit den T18- und T25-Fragmenten der Adenylatcyclase von *Bordetella pertussis* fusioniert, in den *E. coli*-Stamm BTH101 ko-transformiert und auf Selektionsplatten getropft. Das Ergebnis wurde nach einer 40-stündigen Inkubation bei 30°C dokumentiert.

Danksagung

Als erstes möchte ich einen ganz besonderen Dank meinem Betreuer Dr. Sven Halbedel aussprechen, der mir die Möglichkeit gegeben hat, an diesem spannenden Thema zu arbeiten, dass immer für eine Überraschung gut war. Du hast stets mit Neugierde den Verlauf meiner Arbeit verfolgt und mich immer mit Rat und Tat unterstützt. Zudem danke ich dir zutiefst, dass du dich dem Schreiben der Paper gewidmet hast und mir damit Zeit gegeben hast, um noch mehr interessante Ergebnisse zu erhalten und dadurch das Verständnis um GpsB und dessen Funktion in *Listeria* zu erweitern.

Ich bedanke mich auch recht herzlich bei meiner akademischen Betreuerin Prof. Dr. Antje Flieger für die Unterstützung während meiner Dissertation und die Übernahme des Erstgutachtens.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. Susanne Engelmann für die Übernahme des Zweitgutachtens, bei Prof. Dr. Marc Bramkamp für die Übernahme des dritten Gutachtens und Prof. Dr. Henning Schmidt für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Vielen Dank auch an Birgitt Hahn für die Unterstützung bei den Infektionsexperimenten und im Laboralltag. Dein selbst angebautes Obst und Gemüse war immer ein Genuss.

Dr. Karan Gautam Kaval möchte ich für den kontinuierlichen Austausch im Labor und das integrierte Englisch-Training danken.

Ein besonderer Dank gilt zudem Dr. Christina Lang, ohne dich wäre die Zeit am RKI nur halb so schön gewesen. Ob ich gut gelaunt war oder zu Tode betrübt - du warst immer zur Stelle und konntest einen zum Lachen bringen. Die Kaffeepausen und abendlichen Unternehmungen mit dir und Stefan Fiedler zählen mit zu den wichtigsten Highlights meiner Zeit hier. Die Donnerstage im Krummelschen Haus mit Steffi Walter und Stefanie Hoffmann werden mir auch fehlen.

Ich danke natürlich auch den restlichen Kollegen und Kolleginnen, Dr. Philipp Auraß, Maren Schlegel, Wiebke Michel, Miriam Hiller, Michael Pietsch, Andre Frühauf, Robert Weber, Ulrike Blaschke, Laura Becker, Bernd Neumann, Simone Dumschat und Susanne Karste für die gute Arbeitsatmosphäre und stetige Hilfsbereitschaft.